



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

CLÁUDIA APOLINÁRIO VARANDAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço
Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

COORDINADORA

Doutora Esmeralda Sofia Costa
Delgado

2019
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

CLÁUDIA APOLINÁRIO VARANDAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço
Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

COORIENTADORA

Doutora Esmeralda Sofia Costa
Delgado

2019
LISBOA

Agradecimentos

À entidade financiadora deste projeto, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da FMV-ULisboa.

À minha orientadora, Professora Solange Gil, e à minha coorientadora, Professora Esmeralda Delgado, por toda a ajuda, simpatia e disponibilidade que demonstraram ao longo da elaboração da presente dissertação. Pelos conhecimentos que me transmitiram; por exigirem sempre mais e melhor pois só assim foi possível alcançar todos os objetivos que tínhamos com este estudo. E por me apoiarem mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo!

À equipa do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UL e ao grupo do Doutor Frederico Aires da Silva, nomeadamente à Doutora Joana Dias, agradeço toda a ajuda e simpatia com que me receberam. Em especial, à Clara Cartaxeiro pelo apoio, dedicação e boa disposição durante os meses de estágio. Obrigada a todos, por estarem sempre disponíveis para me ajudar e dar conselhos!

Porque seria impossível mencionar cada um e correndo o risco de me esquecer de alguém, agradeço a toda a equipa do Hospital Escolar Veterinário desde médicos, enfermeiros, auxiliares e rececionistas com os quais tive oportunidade de trabalhar e aprender ao longo do meu estágio curricular. São um exemplo de trabalho e dedicação. Obrigada aos estagiários com os quais partilhei momentos de aprendizagem, mas também de alegria e diversão.

Agradeço ao Doutor Hugo Pereira, à Professora Ana Mafalda Lourenço e à Professora Berta São Braz por tornarem possível a recolha de alguns dos casos deste estudo.

Ao Professor Telmo Nunes e ao Mestre André Almeida pela ajuda na análise estatística.

Às amigas que a faculdade me trouxe porque todos os momentos que vivemos durante estes anos ficarão sempre no meu coração. Sofia Guerreiro, Mariana Nunes, Rita Dias, Rita Rosa, Sofia Almeida, Liliana, Marta, Mariana Louro, Beatriz, Brigitte, Helena, Ana e Alexandra.

À minha família, irmã, avós, padrinhos, afilhados, por estarem sempre a meu lado e a torcer incondicionalmente por mim.

À minha mãe, minha guerreira, por me ter ajudado a chegar até aqui. Obrigada por seres uma mulher “de armas” e me apoiares em todos os momentos apesar de estarmos longe uma da outra.

Ao meu amor, Rafael, obrigada por estares sempre comigo! Tem sido um caminho longo e difícil, mas contigo tudo parece ser mais fácil. És o sorriso na minha vida!! Amo-te.

Kika, Lara, Blu, Sam e Quilla, os melhores amigos de quatro patas!

CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

Resumo

A conjuntivite alérgica canina (CAc) é a causa mais comum de conjuntivite em cães, e integra frequentemente a sintomatologia da dermatite atópica canina (DAc).

Com este estudo pretende-se contribuir para uma melhor caracterização clínica e imunológica da CAc através da avaliação da expressão da IL-6, TNF- α e IL-12 nesta doença. Para este fim recorreu-se a um grupo de animais diagnosticados concomitantemente com CAc e DAc no HEV-FMV (n=20) e a um grupo controlo (n=21). Os pacientes foram caracterizados clinicamente recorrendo a um *score* de CAc e ao sistema de classificação *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version* (CADESI-04) e foram realizadas biópsias conjuntivais. A partir destas amostras fez-se a quantificação relativa da expressão génica das três interleucinas por qRT-PCR. Os resultados foram calculados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para comparar a expressão génica das interleucinas entre o grupo atópico e o grupo controlo utilizou-se o *Welch Two Sample t-test*. De seguida, aplicou-se a correlação de Spearman para avaliar a correlação entre a expressão das interleucinas e o *score* de CAc, e procedeu-se da mesma forma para os valores relativos ao CADESI-04.

Os resultados obtidos pela técnica de qRT-PCR permitiram verificar uma sobreexpressão génica de IL-6 e IL-12, de 291.48 ($p=1.306e-09$) e 4.85 ($p=0.00033$) *folds*, respetivamente, nos animais com conjuntivite alérgica. Apesar de a expressão média de TNF- α estar aparentemente aumentada no grupo experimental (7.33 *folds*), não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0.18$). Os resultados sugerem que quanto maior o *score* de CAc maior a expressão génica de TNF- α (Rho=-0.57; $p=0.02$) e IL-12 (Rho=-0.50; $p=0.049$). Não se verificou nenhuma correlação entre os níveis de expressão génica das interleucinas e os valores de CADESI-04.

Com este estudo verificou-se um aumento das citocinas pró-inflamatórias na CAc, importantes na resposta imunitária inata, e uma ativação de uma resposta Th1, apontando assim a IL-6 e IL-12 como potenciais alvos de imunoterapia nos animais com esta doença. Os resultados sugerem ainda que a expressão génica destas três interleucinas possa ser uma ferramenta útil no diagnóstico e classificação da CAc, mas não da DAc.

Palavras-chave: Conjuntivite alérgica canina, dermatite atópica canina, interleucina 6, TNF- α , interleucina 12, *score* de CAc, CADESI-04.

CONTRIBUTION TO IMMUNOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERIZATION OF CANINE ALLERGIC CONJUNCTIVITIS

Abstract

Canine allergic conjunctivitis (cAC) is the most common type of conjunctivitis in dogs and is often included in the symptoms of canine atopic dermatitis (cAD).

With this study we aimed to contribute to improve the clinical and immunological characterization of cAC through the evaluation of IL-6, TNF- α and IL-12 expression in this disease. For this purpose, conjunctival biopsies were performed on a group of 20 animals diagnosed with both cAC and cAD and a control group (n=21). From those samples, a relative quantification of the interleukin's mRNA expression was performed by qRT-PCR. The results were obtained through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

To compare interleukin gene expression between the atopic group and the control group Welch Two Sample t-test was used. Then Spearman correlation was applied to evaluate the correlation between interleukin gene expression and cAC clinical score, the same procedure was used for the CADESI-04 values.

The results provided by qRT-PCR showed a significant gene overexpression of respectively 291.48 ($p=1.306e-09$) and 4.85 ($p=0.00033$) folds on IL-6 and IL-12 in dogs with allergic conjunctivitis. Even though the average expression of TNF- α seems apparently higher in the experimental group (7.33 folds), there were no statistical significant differences between the atopic and the healthy group ($p=0.18$). The results suggest that the higher the cAC score, the greater the TNF- α (Rho=-0.57; $p=0.02$) and IL-12 (Rho=-0.50; $p=0.049$) gene expression. There was no correlation between the interleukin gene expression levels and the CADESI-04 values.

The results indicate an increase of pro-inflammatory cytokines in cAC, which are strongly involved on the innate immune response, and a Th₁ subset activation, identifying IL-6 and IL-12 as potential targets for immunotherapy. This study suggests that the gene expression of those three interleukins may be an useful tool for cAC diagnose and classification, but not for cAD.

Keywords: Canine allergic conjunctivitis, canine atopic dermatitis, interleukin 6, TNF- α , interleukin 12, allergic conjunctivitis clinical score, CADESI-04.

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas, Unidades e Símbolos	ix
CAPÍTULO I – Relatório de Estágio Curricular	1
1. Atividades desenvolvidas	1
1.1. Medicina Interna	1
1.2. Cirurgia	1
1.3. Imagiologia	2
1.4. Internamento.....	2
1.5. Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (UIDI).....	3
1.6. Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-ULisboa.....	3
1.7. Comunicação Oral no decorrer do estágio	3
1.8. Comunicações científicas.....	3
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica	4
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	4
2. DERMATITE ATÓPICA CANINA	5
2.1. Introdução	5
2.2. Sinais Clínicos	5
2.3. Diagnóstico	7
2.4. Tratamento	8
3. CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA.....	9
3.1. Introdução	9
3.2. Conjuntiva.....	10
3.3. Epidemiologia	10
3.4. Sinais clínicos	11
3.5. Diagnóstico	13
3.5.1. Anamnese.....	15
3.5.2. Exame oftalmológico completo	15
3.5.3. Citologia da conjuntiva	16
3.5.4. Biópsia da conjuntiva.....	17
3.5.5. Teste de provocação conjuntival.....	17
3.6. Tratamento	18
3.6.1. Vasoconstritores	19
3.6.2. Anti-histamínicos	19
3.6.3. Estabilizadores da membrana celular dos mastócitos	20
3.6.4. Anti-inflamatórios não esteroídes	20
3.6.5. Corticosteróides	20
3.6.6. Imunossupressores	21
3.6.7. Imunoterapia alérgico-específica	22
4. IMUNOLOGIA	23
4.1. Sistema imunitário: uma visão geral	23
4.1.1. Sistema imunitário inato	23

4.1.2. Sistema imunitário adquirido	23
4.1.3. Linfócitos T	24
4.1.4. Citoquinas	25
4.2. Conjuntivite alérgica e imunologia	25
4.2.1. Fisiopatologia da conjuntivite alérgica	26
4.2.1.1. Fator de necrose tumoral alfa	28
4.2.1.2. Interleucina 6	30
4.2.1.3. Interleucina 12	31
4.2.1.4. Interleucina 10	32
CAPÍTULO III – Contribuição para a Caracterização Clínica e Imunológica da Conjuntivite Alérgica Canina	33
1. Objetivos	33
2. Materiais e Métodos	33
2.1. Amostra em estudo	33
2.2. Critérios de seleção da amostra	33
2.3. Avaliação dermatológica	34
2.4. Avaliação oftalmológica	35
2.5. Colheita de amostras	35
2.6. Processamento de amostras	36
2.6.1. Extração de RNA	36
2.6.2. Tratamento com DNase	36
2.6.3. Síntese de DNA complementar	37
2.6.4. Seleção dos primers	37
2.6.5. PCR quantitativa em tempo real	38
2.7. Análise estatística	39
CAPÍTULO IV – Resultados	40
1. Caracterização da amostra	40
2. Avaliação oftalmológica	40
3. Avaliação dermatológica	41
4. Avaliação da expressão das interleucinas por qRT-PCR	41
5. Coeficiente de correlação entre variáveis	42
5.1. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 e o score de CA	42
5.2. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 e o CADESI-04	44
CAPÍTULO V – Discussão	45
1. Caracterização da amostra em estudo	45
2. Avaliação da expressão do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 na conjuntivite alérgica canina	46
3. Valor diagnóstico da expressão das interleucinas	49
4. Limitações do estudo	50
5. Perspetivas futuras	50
CAPÍTULO VI – Conclusões	51
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXO I: Abstract da comunicação oral apresentada no Congresso da ESVO 2018: “The Role of Pro-inflammatory and Th1 Cytokines in Allergic Conjunctivitis”	68

ANEXO II: Abstract do Poster Científico apresentado no Congresso do CIISA 2018: “Expression of Pro-inflammatory and Th1 Cytokines in Canine Allergic Conjunctivitis”	69
ANEXO III: Declaração de consentimento informado	71
ANEXO IV: Tabela de classificação CADESI-04 (adaptado de Olivry et al., 2014)	72
ANEXO V: Ficha de “Colheita de Biópsia de Conjuntiva” (Côrte-Real, 2015).	73
ANEXO VI: Dados dos animais incluídos no estudo.	75
ANEXO VII: Resultados dos exames oftalmológicos do grupo controlo e do grupo atópico.	76
ANEXO VIII: Avaliação quantitativa dos sinais clínicos de conjuntivite alérgica canina.	78
ANEXO IX: Score total obtido para cada animal do grupo atópico através da aplicação do (CADESI)-4.	79

Lista de Figuras

Figura 1 - Lesões típicas de DAc.....	6
Figura 2 - Lesões típicas de CAc.....	13
Figura 3 – Esquema ilustrativo da fase de sensibilização (adaptado de Leonardi, 2013b)..	27
Figura 4 – Esquema ilustrativo da fase precoce e da fase tardia da alergia ocular (adaptado de Leonardi, 2013b).....	28
Figura 5 - Biópsia de conjuntiva passo-a-passo obtida a partir do fórnix conjuntival inferior (Fotografias originais).	36

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Critérios de Favrot recomendados pelo ICADA para o diagnóstico de DAc.	7
Tabela 2 – Critérios de diagnóstico de CA em Medicina Humana (Takamura et al., 2017)..	14
Tabela 3 - Critérios de inclusão e exclusão para a amostra em estudo.	34
Tabela 4 - Sequência dos primers utilizados no qRT-PCR.....	37

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição percentual das cirurgias assistidas por área de especialidade.	2
Gráfico 2 - Distribuição e gravidade dos sinais clínicos de CAc para o olho esquerdo (O.E.) e direito (O.D.).....	41
Gráfico 3 - Quantificação relativa da expressão das citocinas nos animais com conjuntivite alérgica relativamente aos animais controlo.	42
Gráfico 4 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de IL-6 na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.....	43
Gráfico 5 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de TNF- α na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.....	43
Gráfico 6 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de IL-12 na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.....	43

Lista de Abreviaturas, Siglas, Unidades e Símbolos

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
CA	Conjuntivite alérgica
CAC	Conjuntivite alérgica canina
CAh	Conjuntivite alérgica humana
CADESI-04	<i>Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DA	Dermatite atópica
DAC	Dermatite atópica canina
DAh	Dermatite atópica humana
DAPP	Dermatite alérgica à picada da pulga
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
HEV	Hospital Escolar Veterinário
Hz	Hertz
ICADA	<i>International Committee on Allergic Diseases of Animals</i>
IFN	Interferão
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ITAE	Imunoterapia alergénio-específica
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
mL	Mililitro
mm/min	Milímetros por minuto
mm Hg	Milímetros de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
PIO	Pressão intraocular
QCS	Queratoconjuntivite seca
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RCAOA	Reações cutâneas adversas de origem alimentar
Rho	Coeficiente de correlação de Spearman
RNA	Ácido ribonucleico

RPL27	Proteína ribossomal 27
TC	Tomografia computadorizada
TCR	Recetor de células T
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TPC	Teste de provocação conjuntival
Treg	Linfócitos T reguladores
TS	Teste de Schirmer
Δ Ct	<i>Delta threshold cycle</i>
$\Delta\Delta$ Ct	<i>Delta delta threshold cycle</i>
μ L	Microlitro
%	por cento
$^{\circ}$ C	graus <i>Celsius</i>
x g	Força centrífuga relativa

CAPÍTULO I – Relatório de Estágio Curricular

O estágio curricular realizou-se no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), entre setembro de 2017 e março de 2018, num total de 1228 horas de trabalho, sob a orientação da Professora Doutora Solange Gil e coorientação da Professora Doutora Esmeralda Delgado. A este período de estágio seguiu-se a componente laboratorial da presente dissertação, no Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-UL, entre maio de 2018 e junho de 2018, com uma carga horária total de 245 horas.

1. Atividades desenvolvidas

No HEV, o horário estabelecido permitiu a rotatividade entre 5 áreas distintas: Medicina Interna, Cirurgia e Imagiologia em turnos de 8 horas, Internamento (turnos de 12 horas, em horário noturno e diurno) e Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (turnos de 5 horas). Todas as funções desempenhadas nas diferentes áreas clínicas foram orientadas e supervisionadas pelo Médico Veterinário ou Enfermeiro Veterinário responsável.

1.1. Medicina Interna

No serviço de Medicina Interna, a autora teve a oportunidade de participar em consultas de medicina preventiva, medicina interna, de primeira e segunda opinião, e de especialidade nomeadamente, oftalmologia, dermatologia, endocrinologia, gastroenterologia, neurologia, ortopedia, reprodução e odontologia.

Durante as consultas, a estagiária foi responsável pela realização da anamnese, exame físico geral ou específico, discussão com o médico responsável acerca dos diagnósticos diferenciais, plano de diagnóstico e terapêutica adequada a cada caso. Foi possível participar e executar vários procedimentos, entre os quais colheita de amostras biológicas (colheita de sangue, colheita de urina por algáliação, zaragatoas vaginais, entre outras), vacinação, desparasitação, colocação de microchip, preparação e administração de fármacos quer por vial oral quer injetável (subcutânea, intramuscular e endovenosa), realização de eutanásias, e realização de punção aspirativa por agulha fina (PAAF).

1.2. Cirurgia

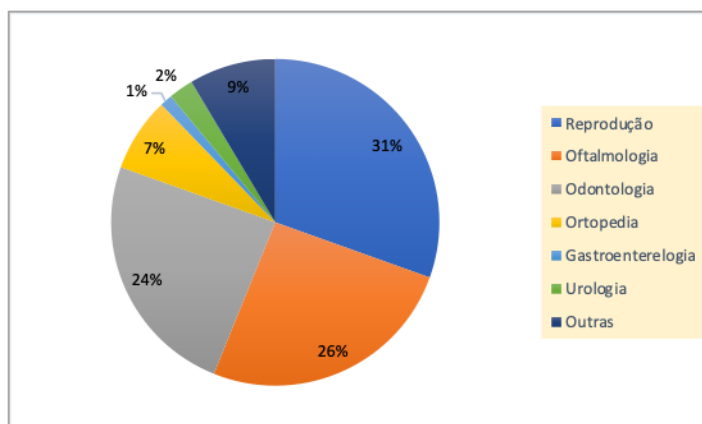
Foi possível à estagiária participar em cirurgias das mais diversas áreas, nomeadamente odontologia, ortopedia, gastroenterologia, reprodução e oftalmologia (Gráfico 1).

Na cirurgia, a autora teve como responsabilidade avaliar os requisitos pré-cirúrgicos (análises hematológicas e bioquímicas, jejum, entre outros) e consequente admissão e receção dos animais para a cirurgia. Fazia ainda parte das funções da estagiária o preenchimento da ficha de internamento do animal, cateterização venosa do paciente, preparação da pré-medicação

anestésica, intubação endotraqueal, indução e monitorização anestésica, tricotomia e assepsia da região a ser intervencionada cirurgicamente.

Durante as semanas que esteve inserida nesta área a estagiária pôde ocupar em cada cirurgia uma das seguintes funções: anestesista, circulante, instrumentista ou ajudante de cirurgião. No pós-operatório, era função da estagiária acompanhar a recuperação anestésica do animal, contactar os tutores do término da cirurgia e participar na elaboração da nota de alta.

Gráfico 1 - Distribuição percentual das cirurgias assistidas por área de especialidade.



1.3. Imagiologia

No serviço de imagiologia, a estagiária teve a oportunidade de acompanhar a realização de ecografias, radiografias e tomografias computadorizadas (TC).

Na radiologia a estagiária teve várias funções, entre as quais posicionar adequadamente os animais, escolher as constantes radiográficas e interpretar as imagens radiográficas obtidas. Na realização de TC, procedeu à cateterização venosa do paciente, indução, manutenção e monitorização anestésica do paciente, posicionamento do mesmo, acompanhamento no recobro, bem como interpretação e discussão das imagens. No que diz respeito à ecografia, foi possível a realização autónoma de ecografias abdominais, identificação e interpretação dos achados ecográficos, e discussão dos diagnósticos diferenciais perante esses achados.

1.4. Internamento

No Internamento Geral realizaram-se turnos de 12 horas (diurnos e noturnos) nos quais foi possível o acompanhamento dos pacientes internados. No início e no fim de cada turno eram apresentados os casos de todos os animais internados, discutindo-se o curso clínico (plano de diagnóstico e terapêutico) a seguir.

Dentro das várias funções desempenhadas pela estagiária podem destacar-se as seguintes: monitorização completa dos pacientes, manutenção dos cuidados básicos de higiene, passeio e alimentação dos animais, venopunção para colocação de cateteres, preparação e administração da medicação prescrita pelo Médico Veterinário responsável e explicação da nota de alta aos tutores.

1.5. Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (UIDI)

As funções desempenhadas na UIDI são aquelas que se realizam no Internamento Geral, sendo que existem neste caso regras que visam a biossegurança da unidade. Os pacientes internados são animais com uma doença infecciosa confirmada, ou com uma suspeita clínica de doença infecciosa a aguardar diagnóstico. Foi assim possível acompanhar casos clínicos de Parvovirose, Esgana, Leucemia Felina, Imunodeficiência Felina, doenças cutâneas infecciosas (dermatites por bactérias multirresistente, por exemplo), entre outras.

O estágio no HEV-FMV permitiu à estagiária desenvolver competências nas mais diversas áreas da prática clínica bem como desenvolver um raciocínio e espírito crítico a aplicar em cada caso clínico.

1.6. Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-ULisboa

A componente laboratorial visou o processamento das amostras para a obtenção dos resultados da presente dissertação. A autora teve a oportunidade de aprender e praticar vários procedimentos, nomeadamente extração de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas, execução da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e eletroforese em gel de agarose.

1.7. Comunicação Oral no decorrer do estágio

Durante o período no HEV, cada estagiário teve a oportunidade de realizar uma apresentação oral para todo o corpo clínico sobre um tema do seu interesse. Por parte da autora foi feita a apresentação do tema “Urgências oculares em pequenos animais” com a duração de aproximadamente 1 hora, na qual expôs as principais urgências que se podem encontrar na prática clínica. Para cada uma delas referiu a etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e abordagem terapêutica.

1.8. Comunicações científicas

Os resultados deste estudo foram apresentados, sob a forma de comunicação oral, no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO – *European Society of Veterinary Ophthalmology*), que se realizou entre 11 e 14 de outubro de 2018, em Praga, República Checa. O respetivo *abstract*, no Anexo I, foi publicado no livro de resumos do Congresso e na versão on-line da revista *Veterinary Ophthalmology*.

Foi ainda possível a apresentação de um *poster* científico no congresso do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), realizado a 16 e 17 de novembro de 2018, em Lisboa, Portugal (Anexo II).

CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO GERAL

O termo “Atopia” refere-se à predisposição individual para a produção de imunoglobulinas E (IgEs) em resposta a baixas doses de alérgenos, geralmente proteínas ingeridas, ocorrendo como consequência a manifestação de sinais clínicos de rinite, conjuntivite e dermatite atópica (World Allergy Organization, 2015). A dermatite atópica (DA) é uma doença crônica inflamatória da pele, sendo o principal sinal clínico o prurido (Barnes, 2010). A conjuntivite alérgica (CA) é uma doença ocular localizada, associada frequentemente a rinite e DA, embora muitas vezes surja como o primeiro e/ou o único sinal de alergia (Leonardi, Motterle & Bortolotti, 2008). Esta é geralmente caracterizada por reações de hipersensibilidade imediata de tipo I, correspondente à resposta imune mais comum da superfície ocular (Stahl & Barney, 2004).

Em Medicina Humana, um elevado número de pacientes tem história de CA associada a outra doença do foro alérgico. Cerca de 30 a 71% dos pacientes com rinite alérgica manifesta sinais clínicos oculares (Leonardi et al., 2015). Estima-se que 6 a 30% da população geral e 30% das crianças manifeste conjuntivite alérgica, como entidade única ou associada a rinite alérgica (Leonardi, Castegnaro, Valerio & Lazzarini, 2015). A presença concomitante de conjuntivite alérgica e dermatite atópica ocorre em 25 a 42% em adultos (De Bruin Weller, Rockmann, Knulst & Bruijnzeel-Koomen, 2013) e em 33% das crianças (Gradman & Wolthers, 2006). Os sinais oculares, quando presentes, são normalmente bilaterais (Bonini et al., 2000). Em Medicina Veterinária, a literatura é escassa no que diz respeito às manifestações oculares da dermatite atópica canina (DAc). Em 1994, Bistner aborda este assunto, descrevendo clinicamente a conjuntivite alérgica e a sua relação com os sinais dermatológicos. Peña & Leiva (2008) associam a DA a manifestações oculares como a conjuntivite, caracterizada por hiperemia conjuntival, blefarospasmo e lesões cutâneas perioculares como eritema e escoriações. Em 2011, num estudo com 60 cães com DA são descritos os diferentes sinais clínicos oculares observados que incluem prurido, hiperemia conjuntival, quemose, corrimento ocular, epífora e queratite concomitante. A prevalência de CA na amostra em estudo foi de 60% (Lourenço-Martins et al., 2011).

A ausência significativa de estudos, em Medicina Veterinária, que abordem a conjuntivite alérgica, desde a sua prevalência, fisiopatologia, manifestações clínicas, diagnóstico e/ou tratamento, revela a importância em expandir o conhecimento acerca desta doença que acomete frequentemente os cães.

Este estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento acerca da conjuntivite alérgica canina em duas vertentes, clínica e imunológica.

2. DERMATITE ATÓPICA CANINA

2.1. Introdução

A DAc é definida como uma doença cutânea alérgica inflamatória e prurítica. Está geralmente associada à produção de IgEs dirigidas contra alérgenos ambientais (Halliwell, 2006). Dos numerosos alérgenos implicados nesta doença podem destacar-se os ácaros do pó (*Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*) e de armazenamento (*Tyrophagus putrescentiae* e *Acarus siro*), pólen de gramíneas, árvores, fungos, antígenos epidérmicos e de insetos (Marsella, Sousa, Gonzales & Fadok, 2012; Bizikova et al., 2015a). A exposição alérgica ocorre geralmente via percutânea, inalatória ou oral (Marsella et al., 2012).

É uma doença multifatorial em que ocorre uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais, imunitários e microbianos (Marsella et al., 2012). Pensa-se que alterações, quer ao nível da barreira cutânea quer ao nível do sistema imunitário, tenham um papel preponderante no desenvolvimento da DAc (Santoro et al., 2015).

A DAc é uma das doenças cutâneas mais comuns em cães com uma prevalência de 3 a 15% na população canina, sendo esta prevalência maior em determinadas raças (Hillier & Griffin, 2001; Hill et al., 2006; Favrot et al., 2010).

Nos últimos anos, o número de casos de DAc tem vindo a aumentar na prática clínica, o que se pode dever ao facto dos animais permanecerem mais tempo no interior das habitações, aumentando assim a exposição a alérgenos do ambiente doméstico, como ácaros do pó e de armazenamento. Para além disso, a crescente popularidade de determinadas raças de cães, mais suscetíveis ao desenvolvimento da DA, contribui também para o aumento da incidência desta doença (Hillier & Griffin, 2001; Favrot, 2014).

A fisiopatologia da DAc é complexa e não está completamente esclarecida. É um processo caracterizado por reações de hipersensibilidade tipo I, no qual a sensibilização a alérgenos ambientais ou alérgenos provenientes de microrganismos ou insetos pode levar à infiltração cutânea de células inflamatórias, ativação de células residentes e produção local de mediadores inflamatórios (Marsella, 2013).

2.2. Sinais Clínicos

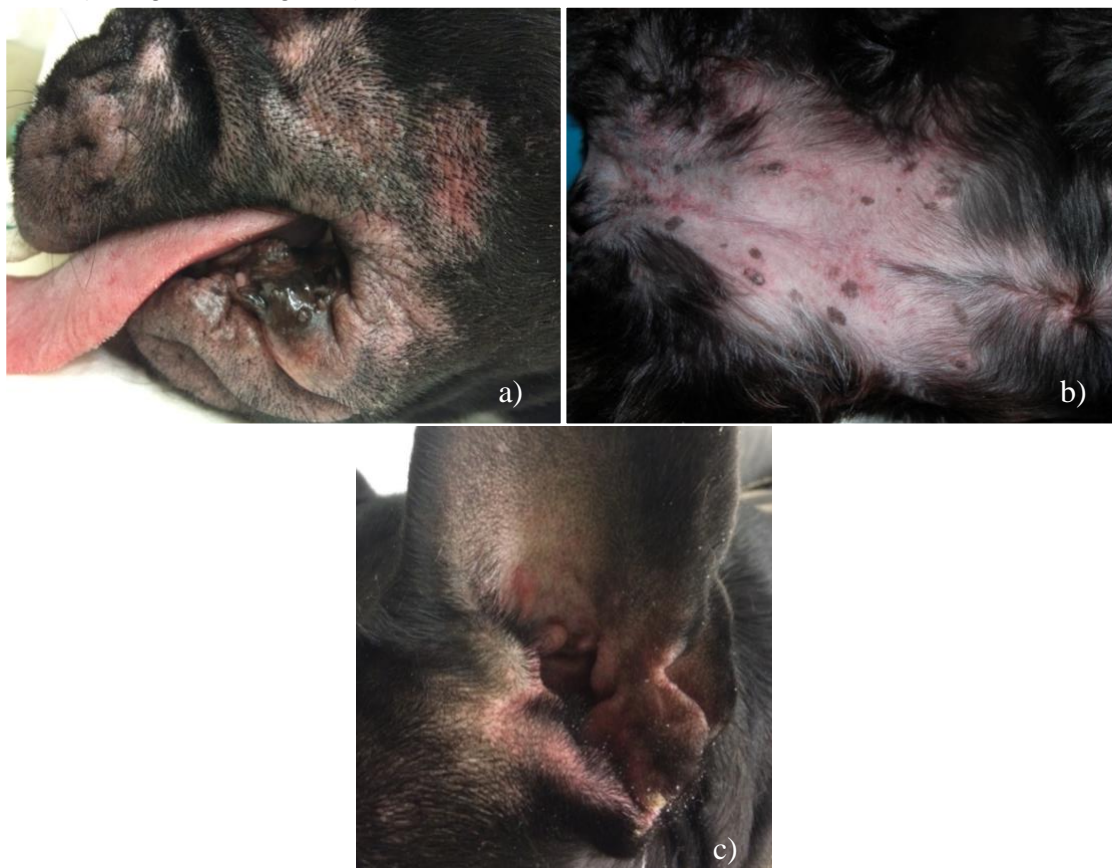
Os primeiros sinais clínicos aparecem normalmente entre os 6 meses e os 3 anos de idade, podendo ser sazonais (42-75%) ou perenes (Griffin & Deboer, 2001; Marsella, 2013).

Considera-se a existência de predisposição de raça na DAc, destacando-se as raças Bouledogue Francês, Boxer, *Cocker Spaniel*, *Golden Retriever*, *Retriever* do Labrador, Pastor Alemão e *West Highland White Terrier* como sendo aquelas que apresentam maior predisposição para o desenvolvimento da doença (Griffin & Deboer, 2001; Favrot, 2014; Bizikova et al., 2015b).

O prurido é o sinal clínico mais comum em cães com DA, o qual se manifesta clinicamente por comportamentos como esfregar ou coçar a face, coçar os pavilhões auriculares, a região abdominal ventral e lamben ou morder as extremidades podais. A ausência deste sinal exclui praticamente o diagnóstico de DAc (Favrot, 2009). Numa fase inicial da doença, o prurido pode surgir associado a lesões cutâneas primárias, nomeadamente eritema e pápulas (Griffin & DeBoer, 2001; Bensignor, Marignac, Crosaz & Cavana, 2013). Com a progressão da doença, é comum observarem-se lesões cutâneas secundárias a auto-traumatismo e inflamação crónica, como escoriações, alopecia, liquenificação, hiperpigmentação e seborreia (Figura 1) (Hensel, Santoro, Favrot, Hill & Griffin, 2015). A otite externa crónica ou recorrente é frequente e constitui muitas vezes o primeiro sinal clínico da DAc (Favrot, 2014).

Outros sinais clínicos dermatológicos (dermatite piotraumática, fistula interdigital), ou não dermatológicos (conjuntivite e rinite alérgica), podem também estar presentes (Favrot, 2014). A distribuição das lesões cutâneas pode ser localizada ou generalizada, e varia de animal para animal. As áreas do corpo mais afetadas incluem a região periocular (especialmente na presença de conjuntivite), focinho (especialmente a região perilabial), face côncava dos pavilhões auriculares, axilas, região flexora do cotovelo, extremidades podais, abdómen ventral, períneo e zona ventral da cauda (Lourenço-Martins et al., 2011; Marsella, 2013; Favrot, 2014).

Figura 1 - Lesões típicas de DAc: a) alopecia e eritema perilabial; b) eritema moderado e pápulas no abdómen ventral e virilhas; c) eritema moderado na face côncava do pavilhão auricular (Fotografias originais)



2.3. Diagnóstico

Uma vez que os sinais clínicos não são patognomônicos da doença e a apresentação clínica pode ser variável, o diagnóstico da DAC pode ser difícil de realizar (Favrot, 2014; Hensel et al., 2015). A diversidade de apresentações clínicas deve-se a fatores genéticos (associados aos fenótipos de raça), à extensão das lesões (localizada *versus* generalizada), ao estadió da doença (agudo ou crônico) e à presença de infecções bacterianas secundárias, entre outros fatores (Wilhem, Kovalik & Favrot, 2011).

Uma ferramenta útil no diagnóstico da DAC são os critérios clínicos, os “critérios de Favrot” (Tabela 1), que auxiliam o médico veterinário na interpretação dos sinais clínicos dos cães com prurido (Favrot, Steffan, Seewald & Picco, 2010). De salientar que o diagnóstico da DAC não se deve basear apenas no cumprimento destes critérios clínicos, devendo estes ser aplicados após a exclusão dos diagnósticos diferenciais (Hensel et al., 2015).

Tabela 1 - Critérios de Favrot recomendados pelo ICADA para o diagnóstico de DAC.

Se forem satisfeitos 5 critérios de cada lista há uma sensibilidade associada de 77,2% a 85,4% e uma especificidade de 79,1% a 83% no diagnóstico de DAC. Se forem satisfeitos 6 critérios, a especificidade aumenta, útil em estudos clínicos, mas a sensibilidade diminui (Favrot et al., 2010).

Lista 1 (utilizada em estudos clínicos)
1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2. Cães que vivem maioritariamente dentro de casa
3. Prurido responsivo a glucocorticoides
4. Infecções cutâneas causadas por leveduras, crônicas ou recorrentes
5. Lesões nas extremidades podais anteriores
6. Lesões nos pavilhões auriculares
7. Margens dos pavilhões auriculares não afetadas
8. Região dorso-lombar não afetada

Lista 2 (utilizada na prática clínica)
1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2. Cães que vivem maioritariamente dentro de casa
3. Prurido antecede o aparecimento das lesões cutâneas (<i>pruritus sine materia</i>)
4. Lesões nas extremidades podais anteriores
5. Lesões nos pavilhões auriculares
6. Margens dos pavilhões auriculares não afetadas
7. Região dorso-lombar não afetada

O diagnóstico da DAC é clínico e baseia-se na anamnese, nos sinais clínicos observados ao exame dermatológico, nos exames complementares de diagnóstico efetuados quando

necessário e na resposta ao tratamento. A avaliação de um animal com prurido deve ser realizada passo-a-passo de forma a descartar possíveis diagnósticos, aproximando assim cada vez mais o médico veterinário do diagnóstico definitivo. Esta abordagem deve incluir o despiste de doenças cutâneas causadas por ectoparasitas, como dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP) e sarna sarcóptica, infecções bacterianas (*Staphylococcus pseudointermedius*) ou fúngicas (*Malassezia pachydermatis*) (Griffin, 2014; Hensel et al., 2015). Para isso, deve ser realizado um exame clínico detalhado bem como raspagens cutâneas superficiais e profundas, tricograma, citologias cutâneas e/ou auriculares e cultura bacteriana, se necessário (Griffin, 2014).

A exclusão de DAPP, sarna sarcóptica ou outras ectoparasitoses pode ser feita através do tratamento com desparasitantes. O teste *gold standard* para o diagnóstico de DA induzida por alimentos é o teste de provocação-eliminação alimentar em que o animal é sujeito a uma dieta caseira ou comercial, que contenha ingredientes com os quais o animal nunca contactou ou uma proteína hidrolisada. Esta deve ser dada em exclusividade e durante pelo menos 8 semanas, seguida de um teste de provocação com a dieta habitual. Se houver remissão completa dos sinais clínicos, a origem alimentar é provável (Hensel et al., 2015).

Os testes intradérmicos ou serológicos para deteção de IgE alérgénio-específica não são utilizados para diagnosticar a DAc. Estes testes alergológicos permitem identificar e selecionar os alérgénios aos quais o animal está sensibilizado com o objetivo de realizar imunoterapia alérgénio-específica (ITAE). O médico veterinário deve recorrer aos testes alergológicos em casos graves, quando a duração dos sinais clínicos é superior a três meses ou quando a terapêutica sintomática é insuficiente no controlo da doença, quer devido aos efeitos adversos dos fármacos prescritos quer devido à falta de cooperação dos tutores (Marsella, 2013; Olivry, Saridomichelakis & ICADA, 2013).

2.4. Tratamento

Em 2015, Olivry et al. atualizaram as diretrizes para o tratamento da DAc apresentadas pelo *International Committee on Allergic Diseases of Animals* (ICADA) em 2010. Estas diretrizes defendem a abordagem multimodal da DAc para além de um tratamento ajustado a cada animal em particular, tendo em conta o quadro clínico, a disponibilidade e custo dos fármacos, os efeitos adversos e a exequibilidade do tratamento (Olivry et al., 2015).

O primeiro passo consiste na identificação e, se possível, na eliminação de fatores desencadeantes de uma crise aguda, nomeadamente ácaros, infestação por pulgas e aumento da exposição a alérgénios ambientais ou alimentares. A utilização de antibióticos tópicos ou sistémicos pode ser necessária se o animal apresentar infecções cutâneas e/ou otites, identificadas através dos sinais clínicos, citologia e/ou cultura. O segundo passo consiste na melhoria da higiene e estado da pele e pelo através, por exemplo, de banhos com champôs não irritantes (Olivry et al., 2010; Olivry et al., 2015).

No manejo da doença crônica podem ser aplicadas medidas de identificação e evicção de alérgenos: a) realização de dieta de eliminação seguida de teste de provocação alimentar em cães com sinais clínicos não sazonais; b) implementação de um plano eficaz para o controle das pulgas, mantido ao longo do ano em regiões endêmicas; c) implementação de medidas de evicção alérgica ambiental, se praticáveis; d) avaliação criteriosa da utilização de antibióticos em caso de infecção cutânea e/ou otite. A melhoria da higiene e do estado da pele e do pelo pode ser feita através de banhos com champôs emolientes biocidas considerando as lesões cutâneas presentes, ou da suplementação com ácidos gordos essenciais. O tratamento sintomático baseia-se na utilização de glucocorticoides tópicos ou de tacrolimus, se o prurido e as lesões cutâneas forem localizados. Em quadros clínicos graves ou generalizados recorre-se a glucocorticoides de administração oral, ciclosporina A, oclacitinib ou lokivetmab (Olivry et al., 2010; Olivry et al., 2015).

Como descrito anteriormente, os testes alérgicos têm como objetivo identificar a sensibilização do animal a um painel de alérgenos de forma a iniciar ITAE. Este tratamento visa promover a dessensibilização do sistema imunitário aos alérgenos através da administração por via subcutânea ou sublingual de uma mistura de extratos alérgicos, podendo ser realizada em conjunto com as opções terapêuticas já mencionadas (DeBoer, 2017).

3. CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

3.1. Introdução

A conjuntivite é uma das doenças oculares mais comuns na prática clínica, podendo ser primária ou secundária a outras doenças oculares ou sistêmicas. É, por isso, importante diferenciá-la de outras doenças com apresentação clínica semelhante, nomeadamente da queratoconjuntivite seca (QCS) (Hartley, 2014).

Os sinais clínicos incluem hiperemia conjuntival, quemose, epífora e corrimento ocular (mucoso, mucopurulento, purulento ou hemorrágico). A conjuntivite alérgica está também associada a prurido ocular (Hartley, 2014).

O termo CA refere-se a reações de hipersensibilidade tipo I que afetam a conjuntiva, a pálpebra e/ou a córnea (Baiula et al., 2014; Leonardi et al., 2017). O olho é provavelmente o órgão mais suscetível para o desenvolvimento de reações alérgicas (Bielory, 2011).

A CA ocorre frequentemente no cão, na maior parte dos casos associada à DAc (Lourenço-Martins et al., 2011). O tratamento desta última permite reduzir os sinais clínicos de conjuntivite (Hartley, 2014).

Em Medicina Humana são cinco os tipos mais comuns de doença ocular alérgica: conjuntivite alérgica sazonal ou perene, conjuntivite papilar gigante, queratoconjuntivite vernal e queratoconjuntivite atópica (Abelson & Schaefer, 1993; Leonardi et al., 2012). Apenas 10%

dos pacientes com alergias apresentam exclusivamente sinais clínicos oculares (Almaliotis et al., 2013). Na maioria dos casos a CA ocorre concomitantemente com outras doenças alérgicas como, por exemplo, asma, rinite e dermatite atópica (Bielory, 2011).

Embora a associação entre a CA e outras doenças do foro alérgico possa levar frequentemente a uma desvalorização da primeira, os sinais oculares são muitas vezes o primeiro e o mais óbvio sinal de alerta (Almaliotis et al., 2013).

3.2. Conjuntiva

A conjuntiva consiste numa membrana mucosa que se estende do limbo esclerocorneano à margem palpebral e está dividida em três porções: a conjuntiva bulbar, que se estende desde a episclera anterior até ao limbo esclerocorneano; a conjuntiva palpebral que reveste a face interna das pálpebras; e a conjuntiva nictitante, que reveste a face anterior e posterior da membrana nictitante. Os dois fundos de saco conjuntival, também designados por fórnix conjuntival, resultam da inversão de sentido da conjuntiva que atravessa a face posterior das pálpebras para a face anterior do globo ocular, ou seja, representam a transição entre a conjuntiva palpebral superior e a conjuntiva bulbar, e a conjuntiva nictitante e a conjuntiva bulbar (Hendrix, 2013).

Histologicamente, a conjuntiva é formada por um epitélio estratificado colunar não queratinizado constituído por células caliciformes. Subjacente a esta camada encontra-se a lâmina própria que consiste em tecido conjuntivo laxo (Mescher, 2016). A nutrição da conjuntiva bem como da córnea é assegurada pelo filme lacrimal que as reveste, conferindo-lhes ainda proteção (Maggs, 2013a).

Em termos de função, a conjuntiva desempenha um papel fundamental no movimento ocular, na produção lacrimal, na cicatrização da córnea e na proteção imunológica do olho. Sendo a membrana mucosa mais exposta de todo o corpo, possui mecanismos de defesa capazes de agir eficientemente perante um agente patogénico (Hendrix, 2013).

3.3. Epidemiologia

Em Medicina Humana, estima-se que a CA afete mais de 40% da população (Singh, Axelrod & Bielory, 2010), sendo uma das doenças mais comuns na prática clínica de um oftalmologista. Esta doença é pouco estudada com entidade independente, sendo estudada normalmente como parte integrante de outras doenças do foro alérgico, especialmente da rinite alérgica (Rosario & Bielory, 2011). Mesmo em pacientes com estas doenças diagnosticadas, as manifestações oculares são pouco valorizadas (Blais, 2007; Bielory, 2010). Desta forma, é muitas vezes subdiagnosticada, estimando-se que 25 a 60% dos pacientes com CAh não sejam diagnosticados (Bauchau & Durham, 2004).

Se a bibliografia sobre a conjuntivite alérgica humana (CAh) não é muito abundante, o cenário da CAc segue a mesma linha, havendo muito poucos estudos que abordem esta doença.

Apesar disso, analisando atentamente os primeiros casos de DAc, verifica-se que já nestes estudos os autores descrevem sinais clínicos de CA. Assim, em 1941, Wittich descreve um cão com sinais sazonais de espirros, epífora, hiperemia conjuntival e corrimento nasal, bem como prurido generalizado. Um caso semelhante, 19 anos depois, relata um cão com sinais de conjuntivite, nomeadamente epífora e prurido ocular (Patterson, 1960). Em 2010, num estudo desenvolvido por dermatologistas em 843 cães atópicos, com o objetivo de caracterizar os sinais clínicos da DAc, verificou-se que 21,5% dos cães apresentavam conjuntivite alérgica sazonal (Favrot, et al., 2010). Num estudo realizado em 60 cães diagnosticados com DA, Lourenço-Martins et al. (2011) demonstraram a presença de sinais oculares ou perioculares em 36 destes, correspondente a 60% dos casos. Para além disso, este estudo enfatiza o facto de a CAc passar despercebida na prática clínica, dependendo sobretudo da especialidade de cada médico. Enquanto que no departamento de dermatologia apenas se diagnosticou CA em 17% dos casos de DAc, no departamento de oftalmologia foi diagnosticada CA em 60% dos casos de cães atópicos observados.

Apesar de todas as raças poderem ser afetadas, cães de raça *West Highland White Terrier*, por exemplo, demonstram uma incidência mais elevada de casos de CAc (Peña & Leiva, 2008).

É possível enumerar alguns fatores de risco desta doença, particularmente a exposição a fatores ambientais como a poluição, residência em áreas industriais ou em espaços pequenos. Para além disso, pensa-se que a conjuntivite alérgica tenha uma forte componente genética (Bielory, 2010).

3.4. Sinais clínicos

De acordo com a duração dos sinais clínicos, a CAc pode ser classificada em aguda ou crónica. A primeira pode durar desde horas a vários dias, enquanto que a segunda persiste durante semanas ou mesmo meses, devendo-se à exposição persistente a um determinado alérgeno (Martin, 2010).

Os sinais clínicos de alergia ocular são o resultado de vários fatores, como a genética, meio ambiente envolvente, microflora ocular e regulação imunitária (La Rosa et al., 2013). As pálpebras servem de obstáculo aos alérgenos enquanto que o filme lacrimal ajuda a removê-los da superfície ocular. Alterações ao nível destas barreiras naturais podem exacerbar a CA (Abelson, Shetty, Korchak, Butrus & Smith, 2015).

A CAc manifesta-se através de diferentes graus de prurido ocular, hiperemia conjuntival, epífora, quemose e corrimento ocular (Figura 2) (Chowdhury, 2013). Os sinais clínicos são normalmente bilaterais, embora possam ocorrer formas assimétricas (Leonardi et al., 2017). O prurido é o sinal clínico mais importante na CA na medida em que a sua ausência exclui praticamente a suspeita sobre esta doença. A histamina, produzida pelos mastócitos conjuntivais, é definida como o principal mediador do prurido, uma vez que ativa os recetores

H1 nas terminações nervosas (Ono & Abelson, 2005; Leonardi et al., 2012). Clinicamente, o prurido manifesta-se através de comportamentos como coçar os olhos com recurso às extremidades podais e esfregar a face em objetos, ou através de sinais como escoriações, alopecia ou outras lesões cutâneas indicativas de prurido (Favrot, 2009).

Outra das manifestações clínicas mais importantes nestes animais é a hiperemia conjuntival. Esta ocorre em resultado da libertação local de mediadores inflamatórios que provocam vasodilatação conjuntival difusa (Leonardi et al., 2017). Sempre que este sinal estiver presente, deve ser realizado um exame oftalmológico completo tendo em conta que são vários os diagnósticos diferenciais de “olho vermelho”. É importante distinguir a hiperemia conjuntival da hiperemia episcleral uma vez que esta última está relacionada com doenças mais graves, algumas das quais com potencial perda de visão para o animal, nomeadamente glaucoma e uveíte (Maggs, 2013a). Para além de outras diferenças, os vasos sanguíneos conjuntivais são menores em diâmetro e têm um padrão ramificado contrariamente aos episclerais (Hendrix, 2013).

O corrimento ocular do tipo seroso é um sinal comum de conjuntivite alérgica (Leonardi et al., 2017). Em casos mais graves, este corrimento pode ser mucoso, resultante de uma hiperprodução das glândulas lacrimais devido à irritação provocada pelos alergénios (Martin, 2010). Eventualmente a coloração do corrimento ocular pode sofrer alterações, assumindo uma tonalidade acizentada ou amarelada devido à acumulação de detritos ou células inflamatórias ou mesmo esverdeada sugerindo a existência de uma infeção bacteriana concomitante, sendo neste caso do tipo purulento ou mucopurulento (Maggs, 2013a).

A quemose é outro dos sinais clínicos que integra a sintomatologia em causa, sendo que nos casos mais graves pode mesmo impedir o encerramento completo das pálpebras predispondo à QCS (Maggs, 2013a). As alergias alimentares, a administração tópica ocular de fármacos e picadas de insetos são algumas das causas de quemose (Hendrix, 2014).

A epífora por si só não é um sinal característico de doença conjuntival, estando normalmente associada a doença corneal, irritação ou obstrução da drenagem naso-lacrimonasal. Na CAC, a epífora representa uma consequência inespecífica do reflexo da glândula lacrimal à forte estimulação antigénica a nível das terminações nervosas conjuntivais e nasais (Leonardi et al., 2017). Assim, esta ocorre geralmente associada a outros sinais característicos da CA (Maggs, 2013a).

Outras manifestações oculares incluem blefarite, queratite e infeção bacteriana secundária. Em casos crónicos pode ocorrer hiperplasia dos folículos linfáticos conjuntivais provocando conjuntivite folicular (Day & Crispin, 2008).

Em Medicina Humana, os pacientes manifestam ainda outros sintomas como visão turva e, em casos mais graves, fotofobia (Suzuki et al., 2006).

Figura 2 - Lesões típicas de CAC.

A alopecia e o eritema periocular são lesões típicas de CAC correspondendo a manifestações clínicas de prurido no cão - a), b) e c). Outro dos sinais clínicos presente nestes animais é a hiperemia conjuntival que pode ser observada quer na conjuntiva bulbar - a) e b) - quer na palpebral - d). Pode verificar-se ainda a presença de corrimento ocular, o qual é normalmente do tipo seroso - a). Quando existe uma infeção bacteriana secundária, este corrimento é mucopurulento - d). Para além dos sinais já descritos pode observar-se também num animal com CA quemose – d) (Fotografias gentilmente cedidas pela Professora Doutora Esmeralda Delgado).



3.5. Diagnóstico

O diagnóstico presumível da CAC é realizado com base na anamnese, exclusão de outras potenciais causas e reforçado por testes alergológicos (Lourenço-Martins et al., 2011; Friedlaender, 2011; Leonardi et al., 2017).

A CAC ocorre após a exposição da conjuntiva a alergénios devido a contacto direto (alergénios veiculados pelo ar ou topicamente), inalação ou ingestão (Maggs, 2013a). Os alergénios mais comuns são pólen, fungos e ácaros domésticos (Hendrix, 2013).

Seja qual for a doença, é importante identificar a causa subjacente a esta para que a abordagem clínica seja o mais eficiente possível. O mesmo se aplica à CA, embora não seja simples reconhecer na maior parte das vezes a sua etiologia (Maggs, 2013a).

Os sinais clínicos gerais e comuns de conjuntivite (hiperemia, corrimento ocular e quemose) não permitem um diagnóstico etiológico nem ajudam na diferenciação entre conjuntivite primária e secundária. Assim, embora a conjuntivite seja considerada a causa mais comum de “olho vermelho”, é importante distingui-la de outras possíveis causas.

A inflamação secundária da conjuntiva pode ocorrer na maior parte das doenças oculares ou perioculares (queratite, blefarite, QCS, dacriocistite, uveíte e glaucoma). Desta forma, a conjuntivite deve ser considerada como um potencial sinal de várias doenças oculares ou até mesmo de doenças sistêmicas (Maggs, 2013a). Sempre que se observe inflamação da conjuntiva num animal deve proceder-se a um exame oftalmológico completo, incluindo a realização de um teste de Schirmer (TS), medição da pressão intraocular (PIO) e teste de fluoresceína (Hendrix, 2013). Uma vez diagnosticada a conjuntivite primária, deve procurar-se obter um diagnóstico etiológico preciso. A conjuntivite pode ser classificada em infecciosa (bacteriana, viral ou parasitária, por exemplo) ou não infecciosa (alérgica ou folicular, por exemplo). As principais causas de conjuntivite canina são não infecciosas, incluindo conjuntivite alérgica, QCS, entrópion e corpos estranhos (Maggs, 2013a).

Em Medicina Humana estão definidos claramente os critérios a ser seguidos para um diagnóstico correto de CA. Em 2015, Sánchez-Hernández et al. propuseram os critérios para a suspeita clínica desta doença. Segundo estes, deve estar presente hiperemia conjuntival bilateral e prurido associados a pelo menos três dos critérios designados a seguir: 1) sinais clínicos oculares associados à exposição a alérgenos suspeitos; 2) presença concomitante de outra doença alérgica (rinite, asma, dermatite atópica); 3) resposta ao tratamento tópico (anti-histamínicos, estabilizadores de mastócitos, entre outros); 4) ausência de conjuntivite papilar gigante e 5) ausência de envolvimento corneal.

Já em 2017, Takamura et al. descreveram para cada local afetado pela CA em Medicina Humana (conjuntiva palpebral, conjuntiva bulbar, conjuntiva nictitante e córnea) os sinais clínicos que podem ser observados, classificando-os de acordo com a gravidade (ausente, ligeira, moderada ou grave) e critérios clínicos de avaliação para cada um deles.

De seguida, definiram os critérios de diagnóstico da CA:

Tabela 2 – Critérios de diagnóstico de CA em Medicina Humana (Takamura et al., 2017).

Diagnóstico Clínico	Presença de sinais clínicos específicos de conjuntivite alérgica.
Diagnóstico “quase” definitivo	Para além do diagnóstico clínico há um resultado positivo nos testes serológicos ou nos testes intradérmicos com identificação de um presumível antigénio.
Diagnóstico definitivo	Para além de um dos diagnósticos anteriores, há um resultado positivo para eosinófilos na citologia conjuntival.

Elaboraram ainda um diagrama que permite a diferenciação entre as cinco entidades clínicas de conjuntivite alérgica no Homem.

Contrariamente à Medicina Humana, em Medicina Veterinária não existem critérios que definam como deve ser realizado o diagnóstico de CAC (Lourenço-Martins et al., 2011). Contudo, é possível enumerar alguns procedimentos que visam o diagnóstico presuntivo de CAC e a tentativa de identificação do(s) alergénio(s) responsáveis pelo quadro clínico, os quais são sumariamente descritos a seguir.

3.5.1. Anamnese

Existem várias questões pertinentes que devem ser colocadas aos tutores de forma a direcionar o médico veterinário para um determinado diagnóstico. É importante questioná-los acerca de qual ou quais o(s) estímulo(s) iatotrópico(s) e duração dos mesmos, se existe envolvimento apenas de um ou de ambos os olhos (*unilateral versus bilateral*), se já realizaram algum tratamento e qual em caso de resposta positiva, e qual o ambiente em que o animal vive (Leonardi et al., 2012).

Uma história pregressa detalhada do paciente com alergia ocular revela normalmente uma história de atopia, bem como a presença de fatores potenciadores da reação nomeadamente ambientais. Assim, este é o primeiro passo crucial no diagnóstico da CA, sobretudo para descortinar entre os diagnósticos diferenciais de “olho vermelho” (Ofri, 2006; Maggs, 2013a).

3.5.2. Exame oftalmológico completo

A presença simultânea de prurido, hiperemia conjuntival e quemose são a base para o diagnóstico clínico de conjuntivite alérgica. Outros sinais como o corrimento ocular e a epífora, embora não sejam característicos de conjuntivite alérgica, quando presentes concomitantemente com aqueles referidos anteriormente, ajudam a reforçar o diagnóstico. Embora os sinais clínicos permitam um diagnóstico relativamente fiável é importante, como referido anteriormente, ter em consideração possíveis diagnósticos diferenciais, uma vez que várias doenças podem mascarar ou mimetizar a CAC (Ofri, 2006). Desta forma, é essencial proceder a um exame oftalmológico completo. Os passos para este procedimento são descritos a seguir (Heinrich, 2014):

- 1) Observação à distância dos olhos, pálpebras e estruturas perioculares com recurso a uma fonte de luz;
- 2) Realização do TS;
- 3) Avaliação da resposta de ameaça e do reflexo palpebral, corneal e pupilar (direto e indireto);
- 4) Tonometria;
- 5) Biomicroscopia com recurso a uma lâmpada de fenda;
- 6) Fundoscopia com oftalmoscópio indireto;

7) Teste de fluoresceína.

O TS é importante para descartar a QCS uma vez que uma produção lacrimal inferior a 5 mm/min é diagnóstica desta doença, enquanto que um valor inferior a 10 mm/min pode inferir uma suspeita da mesma se associado a outros sinais clínicos característicos (Featherstone & Heinrich, 2014). O exame detalhado de toda a superfície conjuntival é essencial para descartar a eventual presença de um cílio ectópico, distiquíase ou um corpo estranho. Para além disso, a biomicroscopia é crucial para a observação e identificação dos sinais clínicos de CA. Se o tipo de corrimento ocular, história de cronicidade ou a ausência de resposta ao tratamento sugerirem a presença de um agente infeccioso, deve proceder-se à colheita de amostras para cultura (Martin, 2010).

3.5.3. Citologia da conjuntiva

A citologia está indicada quando existe a suspeita de uma doença infecciosa, inflamatória ou neoplásica. Permite identificar agentes infecciosos (bactérias e fungos) e fornecer informação em termos da sua morfologia, número e localização (intracelular/extracelular). É possível ainda caracterizar o tipo de inflamação presente e identificar células neoplásicas (Featherstone & Scurrrell, 2015).

Consiste num procedimento rápido e de fácil execução, demonstrando uma boa correlação com os resultados de técnicas mais invasivas como a biópsia (Bonini, 2006).

Esta técnica é útil no diagnóstico da conjuntivite canina, sobretudo na conjuntivite alérgica, uma vez que a presença de um único eosinófilo na citologia é considerada critério de diagnóstico desta doença. Contudo, a ausência deste achado citológico não exclui este diagnóstico (Featherstone & Scurrrell, 2015). Células plasmáticas e linfócitos são os achados mais frequentes na resposta alérgica no cão (Hendrix, 2013). A suspeita de uma infeção bacteriana ou viral deve remeter para a realização de uma zaragatoa conjuntival para cultura (Day & Crispin, 2008).

Antes de se proceder à citologia, é necessário realizar uma limpeza prévia da superfície ocular, de forma a remover o excesso de detritos superficiais e muco. A citologia conjuntival deve ser realizada no fornix conjuntival ventral, em ambos os lados da membrana nictitante (Featherstone & Heinrich, 2014). A amostra ideal apresenta uma única camada de células com a estrutura intacta. Podem ser utilizados diferentes instrumentos, nomeadamente uma zaragatoa, a extremidade romba de uma lâmina de bisturi esterilizada, uma espátula de Kimura ou uma *cytobrush* (Day & Crispin, 2008). A citologia com zaragatoa é o método menos traumático e por isso o mais fácil de executar. Embora garanta a integridade celular, a amostra celular recolhida é muitas vezes pequena, impossibilitando o diagnóstico. Por esta razão as zaragatoas são preferencialmente utilizadas para a colheita de amostras microbiológicas. Pelo contrário, as restantes técnicas permitem recolher uma amostra de células por raspagem mais profunda (Hendrix, 2013). É necessária anestesia tópica para todas as técnicas

referidas, à exceção da zaragatoa. Após a recolha da amostra, esta deve ser transferida para uma lâmina, fixada e corada de forma a ser posteriormente analisada microscopicamente (Featherstone & Heinrich, 2014).

3.5.4. Biópsia da conjuntiva

A biópsia conjuntival pode ser executada sem sedação na maior parte dos animais. A área da conjuntiva a ser manipulada deve ser anestesiada através da aplicação de duas gotas de anestésico ocular tópico (cloridrato de oxibuprocaina, por exemplo), aplicadas com 5 minutos de intervalo entre si. O procedimento é realizado pelo médico veterinário com o auxílio de outro médico ou um enfermeiro veterinário. Enquanto este último imobiliza a cabeça do animal e everte a pálpebra, o médico veterinário destaca delicadamente uma pequena área de conjuntiva com o auxílio de uma pinça, seccionando-a de seguida com uma tesoura de tenotomia. Geralmente não se verifica hemorragia. Contudo, quando esta ocorre é mínima e facilmente controlada através de uma ligeira pressão digital (Featherstone & Scurrrell, 2015). A amostra deve ser acondicionada num meio adequado até se proceder à sua análise histopatológica.

O local da biópsia é o mesmo que o da citologia, tendo em conta que se deve evitar os vasos conjuntivais de maior calibre (Featherstone & Heinrich, 2014).

As biópsias conjuntivais de pacientes alérgicos apresentam hiperplasia das células epiteliais e caliciformes, metaplasia escamosa ou ulceração, infiltração eosinofílica, presença epitelial de numerosos mastócitos e infiltração linfoplasmocítica em lesões crónicas (Bielory, 2000; Day & Crispin, 2008).

3.5.5. Teste de provocação conjuntival

O teste de provocação conjuntival (TPC) tem revelado ser útil quer na área de investigação da conjuntivite alérgica quer na prática clínica como teste diagnóstico em humanos (Bonini, 2006). O facto de mimetizar o quadro clínico da CA tem potenciado uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos desta doença. Para além disso, são também utilizados para avaliar a eficácia de potenciais fármacos para tratamento (Mortemousque et al., 2004).

Estes testes permitem avaliar os efeitos inflamatórios na superfície ocular após a aplicação tópica de um alergénio num paciente presumidamente sensibilizado. Assim, o objetivo é avaliar a reatividade da mucosa ocular a alergénios específicos (Fauquert et al., 2017).

Para além de ser específico, o TPC é considerado o método mais simples para confirmar ou descartar a contribuição de um determinado alergénio no desenvolvimento da CA (Rico, 2014).

Em Medicina Veterinária foram utilizados pela primeira vez por Lourenço-Martins et al. (2011) num estudo desenvolvido no HEV-FMV com o objetivo de avaliar a utilidade de um TPC em cães com DA sensibilizados para dois ácaros do pó (*Dermatophagoides farinae* e

Dermatophagoides pteronyssinus). Os resultados obtidos demonstraram uma relação estatisticamente significativa entre a presença de sensibilização para os ácaros do pó e um TPC positivo, confirmando a existência de uma relação causal entre estes alergénios e os sinais oculares nos pacientes avaliados.

O procedimento implica a utilização de um controlo negativo (solução salina) no olho contralateral ao qual é feita a administração tópica de concentrações crescentes de extratos de alergénios diluídos. As aplicações são intervaladas de 15 minutos até que o resultado seja positivo. É atribuído um *score* entre 0 (ausente) e 3 (grave) a cada um dos sinais clínicos de CA, sendo o resultado positivo quando o *score* total obtido é superior a 5 (Lourenço-Martins et al., 2011).

3.6. Tratamento

O tratamento da CAC deve ser baseado na gravidade de cada caso, englobando o tratamento não farmacológico e o tratamento farmacológico (Mashige, 2017). A primeira abordagem terapêutica visa evitar ou controlar a doença em causa sem que seja necessário recorrer à utilização de fármacos. O primeiro passo a ser implementado consiste em minimizar a exposição a alergénios que desencadeiam uma resposta de hipersensibilidade nestes pacientes (Martin, 2010). Em Medicina Humana são indicadas algumas medidas preventivas que podem ser aplicadas no dia a dia de um paciente com história de CA, nomeadamente a utilização de óculos de sol, aplicação de lubrificantes oculares ou lavagens com soro fisiológico (Bonini, 2006; O'Brien, 2013).

A lágrima artificial providencia uma função de barreira e permite melhorar a primeira linha de defesa ao nível da mucosa conjuntival. A sua aplicação promove a diluição de alergénios e mediadores inflamatórios presentes na superfície ocular, mantendo-a assim livre destes agentes (La Rosa et al., 2013). Quer a lágrima artificial quer os lubrificantes oculares não têm uma eficácia direta nos mediadores inflamatórios. Estes providenciam apenas um alívio temporário dos sinais clínicos e têm pouco ou nenhum efeito em casos moderados a graves (O'Brien, 2013). Outra estratégia não farmacológica é, por exemplo, a aplicação de compressas frias que promovem a vasoconstrição, reduzindo assim o edema e a hiperemia conjuntival (Sánchez-Hernández et al., 2015).

Este maneio da doença deve ser associado a uma terapêutica sintomática baseada na utilização de estabilizadores de mastócitos, anti-histamínicos orais ou tópicos, vasoconstritores, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticosteroides tópicos e imunossupressores tópicos (Williams & Sheppard, 2005; Bonini, Gramiccioni, Bonini & Bresciani, 2007; Bielory, 2008; Chowdhury, 2013). Pode ser necessário recorrer ao uso de antibióticos tópicos caso haja uma infeção bacteriana secundária concomitante. Deve considerar-se, contudo, que alguns antibióticos como a neomicina podem provocar conjuntivite, podendo assim agravar o quadro clínico já existente (Maggs, 2013b).

Todos os fármacos tópicos devem ser armazenados no frio de forma a promoverem um efeito adicional na redução dos sinais clínicos quando aplicados na superfície conjuntival (Bielory, 2006).

3.6.1. Vasoconstritores

Os vasoconstritores, agonistas α -adrenérgicos, reduzem a hiperemia conjuntival resultante da vasodilatação que ocorre na CA (Bielory, 2012). Estão descritos vários efeitos adversos, nomeadamente ardor, durante a sua aplicação bem como midríase (Abelson et al., 1990; Spector & Raizman, 1994). A utilização crónica destes fármacos predispõe a taquifilaxia (Abelson, Butrus, Weston & Rosner, 1984). Apesar de não serem muito utilizados, quando são prescritos associam-se normalmente a um anti-histamínico tópico (Abelson et al., 1990).

3.6.2. Anti-histamínicos

A sinalização dos recetores H1 e H2 da histamina resultam em prurido, hiperemia conjuntival, secreção de citocinas, proliferação de fibroblastos, expressão de moléculas de adesão e aumento da permeabilidade microvascular (Abelson, McLaughlin & Gomes, 2011; Leonardi, 2013a; Gomes, 2014). Os anti-histamínicos são antagonistas competitivos e reversíveis dos recetores H1 da histamina, o principal mediador inflamatório responsável pelos sinais clínicos da CA (Mantelli, Calder & Bonini, 2013). Assim, não apresentando efeito sobre outros mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas e os leucotrienos, a ação destes fármacos nos recetores da histamina permite reduzir o prurido e a hiperemia conjuntival (Leonardi, Marchese, Marseglia & La Rosa, 2007; Erdinest & Solomon, 2014).

No tratamento da CAC, o médico veterinário pode optar por um anti-histamínico sistémico ou tópico. Quando os sinais clínicos são maioritariamente oculares, os anti-histamínicos tópicos são preferíveis aos sistémicos, uma vez que, para além de serem mais seguros, têm um efeito mais rápido (Abelson et al., 2011). Contudo, devido à sua curta duração, devem ser aplicados pelo menos quatro vezes por dia. Podem provocar irritação ocular, sobretudo se forem utilizados durante um longo período de tempo (Leonardi et al., 2007). Os anti-histamínicos sistémicos, como a cetirizina, têm uma eficácia limitada na conjuntivite alérgica para além de poderem causar QCS, pelo que devem ser evitados caso não esteja presente outra doença concomitante como rinite ou sinusite (Brutus & Portela, 2005; O'Brien, 2013).

Os anti-histamínicos da segunda geração são preferíveis aos da primeira, uma vez que são mais seguros e eficazes (Bielory, 2006).

O cetotifeno e a olopatadina têm uma ação dupla, ou seja, atuam como estabilizadores de mastócitos e antagonistas seletivos dos recetores H1 (Sánchez-Hernández et al., 2015). Estes fármacos são rápidos a atuar e têm um efeito duradouro devido à sua habilidade para suprimir a libertação de mediadores da inflamação e inibir o recrutamento de células inflamatórias (Bielory, 2012).

3.6.3. Estabilizadores da membrana celular dos mastócitos

Os estabilizadores da membrana dos mastócitos inibem a desgranulação destas células, bloqueando assim a libertação de mediadores inflamatórios (Sorkin & Waard, 1986) e a ativação da cascata do ácido araquidónico (Owen, Shah, Henshaw, Smeeth & Sheikh, 2004). Diminuem o influxo de monócitos, eosinófilos e neutrófilos após a exposição ao alergénio (Galatowicz, Ajayi Stern & Calder, 2007; Leonardi & Quintieri, 2010).

Considera-se que estes fármacos possam ser eficazes no tratamento da CAC, contudo, o seu custo e o facto de serem mais eficazes quando aplicados antes da exposição aos alergénios limitam a sua utilização (Martin, 2010). Desta forma, embora o efeito no alívio dos sinais clínicos seja limitado, podem ser usados profilaticamente para prevenir a desgranulação dos mastócitos subsequente à exposição a um alergénio (La Rosa et al., 2013).

Não são normalmente prescritos pelos médicos veterinários e, quando o são, prescrevem-nos associados a corticosteroides (Maggs, 2013b).

A olopatadina, a lodoxamida e o cromoglicado de sódio são exemplos de estabilizadores da membrana celular dos mastócitos (Cook, Stahl, Barney & Graziano, 2002; Maggs, 2013b).

3.6.4. Anti-inflamatórios não esteroides

Os AINEs são inibidores específicos das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) o que impede a síntese dos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Bisca, 1997; Swamy, Chilov, McClellan & Petsoglou, 2007). Reduzem os sinais clínicos da CA, como a hiperemia conjuntival e o prurido (Kari & Saari, 2010), e são considerados uma alternativa aos corticosteroides embora sejam menos potentes (Martin, 2010). Como efeitos adversos estão descritas sensações de ardor e irritação ocular (Abelson et al., 2015).

O diclofenac, o ketorolac e o flurbiprofeno são exemplos de AINEs tópicos utilizados em Medicina Veterinária (Giuliano, 2004).

3.6.5. Corticosteroides

O tratamento da CA com anti-histamínicos tópicos, estabilizadores da membrana dos mastócitos e AINEs é frequentemente ineficaz, sendo necessário recorrer a corticosteroides tópicos (Bonini et al., 2000). Estes proporcionam um tratamento eficaz da CA mesmo em casos mais graves ou crónicos (Spector & Raizman, 1994; Bielory, Perez & Bielory, 2010).

Os corticosteroides interferem na via da ciclooxigenase e da lipoxigenase através da produção de inibidores da fosfolipase A₂, enzima responsável pela formação do ácido araquidónico (Bisca, 1997). Impedem a diferenciação de linfócitos T ativos em linfócitos Th2 e consequentemente a transcrição de citocinas Th2 (La Rosa et al., 2013). Inibem a proliferação e o recrutamento dos mastócitos e diminuem a produção de eosinófilos, enquanto induzem a sua apoptose e destruição fagocitária (Fukui, 2008; Baiula et al., 2011).

A utilização de corticosteroides tópicos está indicada se os sinais clínicos forem apenas oculares; se os sinais de alergia forem generalizados recorre-se a corticosteroides sistémicos (Martin, 2010). A concentração e frequência utilizadas devem ser as mínimas necessárias para o controlo da doença (Maggs, 2013a).

Estes fármacos, particularmente a dexametasona e a prednisolona, são prescritos em casos mais graves, embora em doses baixas possam ser utilizados em qualquer situação por curtos períodos de tempo (Mishra, Tamboli, Jwala & Mitra, 2011; Sánchez-Hernández et al., 2015). Isto prende-se com o facto de os corticosteroides tópicos apresentarem graves efeitos adversos quando aplicados durante longos períodos de tempo, podendo destacar-se o glaucoma e as infeções secundárias, bacterianas ou fúngicas como exemplos. Por este motivo a utilização destes fármacos tópicos deve ser limitada e cuidadosamente monitorizada nestes animais (Bonini et al., 2000; Maziak et al., 2003, Comstock & Decory, 2012; Leonardi, 2013a).

Para além dos já mencionados, são ainda exemplos destes fármacos a fluorometolona, a rimexolona e o loteprednol (Bielory & Friedlaender, 2008). Está descrito que o loteprednol tem uma menor propensão para elevações da PIO comparativamente com os restantes (Novack, Howes, Crockett & Sherwood, 1998).

3.6.6. Imunossupressores

Uma alternativa aos corticosteroides são os fármacos imunossupressores, como a ciclosporina A e o tacrolimus, que embora não demonstrem um efeito rápido como os primeiros, são fármacos seguros em tratamentos prolongados (Erdinest & Solomon, 2014).

Os mecanismos de ação dos imunossupressores baseiam-se na inibição da ativação das células T (Guaguère, Steffan & Olivry, 2004; Payvandi et al., 2005). Como resultado, várias citocinas não são expressas incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 e TNF- α (Sengoku, Morita, Sakuma, Motoyama & Goto, 1999; Matsuda & Koyasu, 2000; Bunikowski et al., 2001). Para além disso, há uma diminuição da libertação de histamina, redução da desgranulação dos mastócitos (Rustin, 2007; Sehgal, Srivastava & Dogra, 2008), quimiotaxia e longevidade dos eosinófilos (Sihra et al., 1997; Marsella & Olivry, 2001), e redução do número e da atividade das células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells*, APCs) (BuBmann, Bieber & Novak, 2009).

No murganho, a ciclosporina A é tao eficaz como os corticosteroides no tratamento da CA (Martin, 2010). Em 2016, Yücel and Ulus comprovaram a eficácia de ciclosporina A tópica a 0,05% no tratamento de pacientes com queratoconjuntivite vernal.

O tacrolimus tem um poder imunossupressor cem vezes superior ao da ciclosporina (Kino et al., 1987). Em Medicina Humana, recorre-se a tacrolimus tópico a 0,1% (Protopic®) para o tratamento da queratoconjuntivite vernal e da queratoconjuntivite atópica (Erdinest & Solomon, 2014).

3.6.7. Imunoterapia alérgico-específica

A ITAE é uma abordagem eficiente em pacientes com doenças alérgicas, tendo já alguns estudos comprovado a sua eficácia no controlo da sintomatologia clínica (Durham et al., 1999; Winther, Malling, Moseholm & Mosbech, 2000). Em Medicina Humana é considerada um tratamento eficaz para pacientes com rinoconjuntivite (Broide, 2009). Está descrita a redução dos sinais clínicos oculares, nomeadamente uma diminuição de cerca de 40% no caso do prurido (Sánchez-Hernández et al., 2015). Em Medicina Veterinária, Rico (2014) revelam que os TPC podem ser utilizados na avaliação da eficácia da ITAE e que esta pode beneficiar cães atópicos com CA associada.

Este tratamento possibilita a melhoria da sintomatologia clínica, a redução da farmacoterapia instituída e consequentemente uma melhor qualidade de vida do animal (Griffin & Hillier, 2001). É uma opção de tratamento segura, embora seja cara e exija uma boa cooperação por parte dos tutores (O'Brien, 2013).

Apesar das múltiplas evidências clínicas dos efeitos da ITAE, tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária, os seus mecanismos exatos ainda não estão completamente esclarecidos (Keppel et al., 2008). Um dos mecanismos imunomoduladores associado à ITAE consiste no desvio da resposta clássica Th2 no sentido de uma resposta Th1 que se deve principalmente ao aumento do rácio IFN- γ /IL-4 (Griffin & Hillier, 2001; Shida et al., 2004). Para além disso, a ITAE é responsável pela indução de uma resistência periférica por linfócitos T reguladores (Treg) (Akkoc, Akdis & Akdis, 2011). Estas células apresentam propriedades imunossupressoras de entre as quais se destaca a capacidade de inibir respostas inflamatórias alérgicas associadas à produção de IgEs. Participam na regulação da homeostasia imunológica através da produção de citocinas como a IL-10 (Keppel et al., 2008). Outra das hipóteses apontadas como mecanismo imunomodulador da ITAE é o aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) que apresentam uma ação bloqueadora (Shida et al., 2004). Ao competirem com a IgE pela ligação aos antígenos circulantes e aos recetores específicos da superfície dos mastócitos, esta classe de anticorpos previne a desgranulação destas células (Akkoc et al., 2011).

O protocolo consiste na administração, sublingual ou subcutânea, de forma gradual e em doses crescentes, dos extratos alérgicos (Kari & Saari, 2010). A escolha dos alérgenos deve ser baseada no resultado dos testes alérgicos, na anamnese, na região geográfica e risco de exposição aos alérgenos em causa (Olivry et al., 2010).

4. IMUNOLOGIA

4.1. Sistema imunitário: uma visão geral

O sistema imunitário é um dos sistemas mais complexo e diversificado do indivíduo. Esta complexidade permite ao organismo neutralizar qualquer potencial ameaça para o mesmo, ao mesmo tempo que pode dar azo a erros dos mecanismos reguladores imunológicos, bem como possibilitar o desenvolvimento de doenças imuno-mediadas (Day, 2008).

É possível distinguir dois subsistemas, o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001).

4.1.1. Sistema imunitário inato

O sistema imunitário inato é definido como a primeira linha de defesa do organismo (Yatim & Lakkis, 2015). As barreiras físicas (pele e cílios, por exemplo) aliadas à ação de células fagocitárias e mediadores inflamatórios caracterizam este subsistema (Day, 2008). A resposta imune inata não é específica para cada agente patogénico em particular (Alberts et al., 2002); está dependente de um grupo de células fagocitárias que reconhecem um número limitado de moléculas expressas pelos agentes patogénicos e são rapidamente ativados no sentido de uma rápida eliminação dos mesmos. Outra das características que define este sistema é a falta de capacidade de memória, o que implica que a resposta a um determinado agente patogénico seja semelhante independentemente do número de vezes a que o organismo já foi exposto (Tizard, 2012).

A resposta das moléculas e células que fazem parte do sistema imunitário inato contra os agentes patogénicos, traumas ou a uma resposta imune local é definida como inflamação. A resposta inflamatória é iniciada pelas células sentinela, nomeadamente macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Os recetores expressos à superfície destas células permitem despoletar uma reação das mesmas a componentes estruturais ou secretados pelos agentes patogénicos ou a determinadas moléculas libertadas por células anormais. A ligação dos recetores das células sentinela a estes componentes desencadeia a libertação de mediadores solúveis que irão ser responsáveis pela resposta inflamatória subsequente. Estes mediadores incluem citoquinas/interleucinas e quimiocinas. Os objetivos cruciais da resposta inflamatória são a neutralização da causa subjacente a este processo, impedir a dispersão sistémica dos agentes patogénicos e reparar o tecido danificado após a sua eliminação (Day & Schultz, 2014).

4.1.2. Sistema imunitário adquirido

A resposta imunitária adaptativa desenvolve-se ao longo do tempo, podendo demorar vários dias ou semanas a tornar-se eficaz (Janeway et al., 2001). Sendo a defesa específica do organismo, é definida como um sistema complexo que, para além de reconhecer os agentes

patogénicos e proceder à sua eliminação, retém uma memória específica desse acontecimento. Desta forma, em exposições subsequentes ao antígeno, a resposta do sistema imunitário adquirido poderá ser mais rápida e eficiente (Clark & Kupper, 2005; Day, 2008).

O sistema imunitário adquirido pode ser dividido em dois ramos diferentes de acordo com o tipo de resposta que é executada: a resposta imunitária humoral essencialmente direcionada contra antígenos extracelulares ou exógenos (bactérias e fungos, por exemplo) na qual os anticorpos produzidos promovem a sua destruição; e a resposta imunitária celular direcionada contra antígenos intracelulares ou endógenos, como por exemplo vírus, bactérias e protozoários intracelulares, na qual células especializadas destroem as células infetadas ou anormais (Tizard, 2012). As principais células intervenientes na resposta humoral são os linfócitos B que se podem diferenciar em plasmócitos com capacidade de produzir anticorpos ou em células B de memória; enquanto que na resposta mediada por células são os linfócitos T (Alberts et al., 2002). A resposta imunitária adaptativa é maioritariamente regulada por populações de células T, sendo que os linfócitos T auxiliares (Th) promovem esta resposta enquanto que os linfócitos T reguladores a inibem (Tizard, 2012).

A principal diferença entre o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido é o tipo de recetores de superfície que utilizam para reconhecer os agentes patogénicos. As células do sistema imunitário inato possuem um número limitado de recetores preformados que se ligam a moléculas que são comumente expressas por uma grande quantidade de agentes. Por outro lado, as células do sistema imunitário adquirido são capazes de gerar a cada instante novos recetores estruturalmente únicos (Clark & Kupper, 2005). Estes dois subsistemas encontram-se intimamente relacionados entre si na medida em que células do sistema imunitário inato são indispensáveis na ativação e desenvolvimento da resposta adquirida (Janeway et al., 2001; Tizard, 2012). É o equilíbrio entre a resposta imunitária inata e adaptativa e em cada uma delas que define o sucesso da resposta imune.

4.1.3. Linfócitos T

Os linfócitos T podem ser classificados de acordo com os seus marcadores de superfície como células CD4⁺ e células CD8⁺. Quando os linfócitos T são sensibilizados pelas APCs diferenciam-se em células T CD4⁺ e em células T de memória (Day, 2008). Os linfócitos T CD4⁺ podem ainda ser classificados consoante o perfil de citocinas e os efeitos imunológicos que produzem como células Th1 e células Th2 (Berger, 2000; Romagnani, 2000).

As células Th2 produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13), interleucina 25 (IL-25), interleucina 31 (IL-31) e interleucina 33 (IL-33), exercendo um efeito antagonista sobre as células Th1 através da IL-4, IL-10 e IL-13. Têm como função mediar a imunidade humoral particularmente a síntese de IgE e uma subclasse de IgG. As células Th1 produzem predominantemente interleucina 2 (IL-

2) e interferon gama ($\text{IFN}\gamma$), antagonizando a ação das células Th2 por meio do $\text{IFN}\gamma$. Exercem um efeito limitador na produção de anticorpos e iniciam a resposta imunitária celular (Day, 2008).

4.1.4. Citoquinas

As células do sistema imunitário são capazes de sintetizar e secretar centenas de proteínas que controlam as respostas imunitárias através da comunicação entre as diferentes células. Estas proteínas são designadas citoquinas (Tizard, 2012). Assim, as citoquinas são um grupo de mediadores proteicos responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos no sistema imunitário, nomeadamente nas respostas do foro alérgico. Estas participam na infeção e na neoplasia, sendo também mediadores importantes em doenças inflamatórias e em doenças autoimunes (Richter, Nasr & Mexas, 2018).

As citoquinas são produzidas em resposta a diferentes estímulos e atuam em diferentes células-alvo (Tizard, 2012). Quando libertadas por uma célula podem exercer o seu efeito sobre a própria célula (autócrina) ou sobre uma célula vizinha (parácrina). Alternativamente, algumas citoquinas podem circular pelo sistema circulatório e exercerem o seu efeito num local distante ao da sua produção (endócrinas) (Day, 2008). Quando estas se ligam aos recetores da célula-alvo alteram o seu comportamento, podendo por exemplo, induzir a diferenciação da célula ou estimular a produção de novas proteínas pela mesma. Alternativamente, podem inibir estes efeitos. Ao atuar em diferentes células-alvo podem induzir um efeito diferente em cada uma delas. Esta característica das citoquinas define-se como pleiotropia. Os efeitos das citoquinas podem ser classificados fundamentalmente em pró-inflamatórios, anti-inflamatórios, quimiotáticos e reguladores de crescimento. Assim, a função global de uma citoquina depende do painel geral de citoquinas e dos seus reguladores num determinado tecido e num determinado momento (Tizard, 2012).

Estes potentes mediadores inflamatórios são principalmente produzidos por linfócitos T e macrófagos, embora possam ser também secretados por outras células que podem ou não fazer parte do sistema imunitário, respetivamente mastócitos e células endoteliais (Zhang & An, 2007).

4.2. Conjuntivite alérgica e imunologia

Devido à localização anatômica do olho e à elevada vascularização e sensibilidade dos vasos sanguíneos da conjuntiva, este órgão é frequentemente alvo de respostas inflamatórias induzidas por reações de hipersensibilidade locais ou sistémicas (Bielory, 2000).

São consideradas quatro as camadas do olho que estão envolvidas em respostas imunitárias: (1) filme lacrimal e conjuntiva, constituem a porção anterior e funcionam como a primeira barreira ocular contra os alérgenos ambientais; (2) esclera; (3) úvea, e (4) retina (Bielory, 2000). O epitélio conjuntival não contém células inflamatórias residentes, como mastócitos,

eosinófilos ou basófilos. Algumas destas células encontram-se na substância própria da conjuntiva, onde existe uma população residente de mastócitos, enquanto que outras migram para estes tecidos em resposta a determinados estímulos (Morgan et al., 1991).

Os sinais clínicos da CA são influenciados pela genética, fatores ambientais, microflora ocular e pelos mecanismos de regulação imunitários. Em conjunto, estes fatores criam uma resposta imunitária complexa (Irkeç & Bozkurt, 2012).

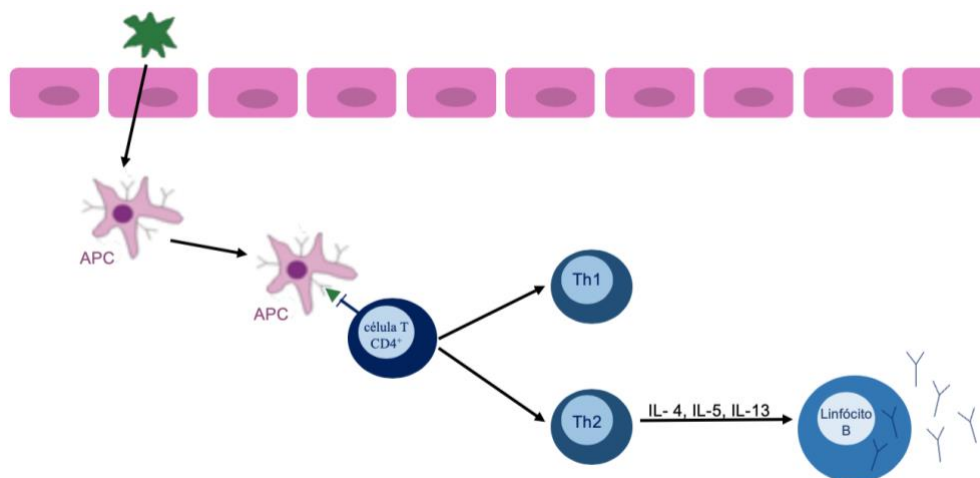
A alergia é definida como uma resposta de hipersensibilidade do sistema imunitário para com antígenos inócuos do meio ambiente (Galli, Tsai & Piliponsky, 2008; Irkeç & Bozkurt, 2012; Day & Schultz, 2014). A fisiopatologia da CA é bastante complexa, mas o mecanismo ainda não está completamente esclarecido. Sabe-se que esta se caracteriza por um mecanismo imunopatogénico de hipersensibilidade do tipo I, em que ocorre uma produção exagerada de IgEs (Ono & Abelson, 2005; Chigbu, 2009).

4.2.1. Fisiopatologia da conjuntivite alérgica

A alergia ocular envolve tipicamente três fases: fase de sensibilização, fase precoce e fase tardia (Irkeç & Bozkurt, 2012).

A fase de sensibilização (Figura 3) inicia-se com a exposição da superfície ocular a antígenos, sem que haja manifestações oculares da resposta alérgica nesta fase (Chigbu, 2009). Quando depositados no epitélio conjuntival, os alérgenos são fagocitados e processados por células dendríticas ou outras APCs, e expressos à superfície destas células ligados aos seus complexos maiores de histocompatibilidade classe 2 (MHC classe II) (Ishida et al., 2010). De seguida, as APCs interagem com os recetores específicos de antígenos dos linfócitos T (TCR) das células T CD4⁺ causando a sua maturação e diferenciação em células T *helper*, predominantemente em células Th2 (Broide, 2009). As citocinas libertadas pelas células Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) estimulam a produção de IgE pelas células B, o crescimento de mastócitos, acumulação de eosinófilos e hiperprodução de muco (Leonardi, 1999). Os anticorpos IgE produzidos, específicos para cada alérgeno em particular, ligam-se a recetores específicos localizados na superfície dos mastócitos e basófilos. Este passo prepara os mastócitos para uma futura exposição ao alérgeno, completando assim o processo de sensibilização (Chigbu, 2009).

Figura 3 – Esquema ilustrativo da fase de sensibilização (adaptado de Leonardi, 2013b).



Quando um olho previamente sensibilizado a um alérgénio sofre nova exposição a este, inicia-se a reação alérgica/hipersensibilidade do tipo I através da ligação do alérgénio aos mastócitos sinalizados por IgE (Butrus & Portela, 2005). Esta ligação provoca a desgranulação dos mastócitos, iniciando-se assim a fase precoce. Da desgranulação dos mastócitos resulta a libertação de uma cascata de mediadores inflamatórios, dos quais se destacam: histamina, proteases (triptase), prostaglandinas e leucotrienos (Chigbu, 2009). O prurido, a hiperemia conjuntival e a quemose, sinais clínicos que caracterizam a fase precoce, são desencadeados por estas moléculas preformadas principalmente pela histamina. Esta é considerada o principal mediador da reação alérgica ocular (Bielory & Ghafoor, 2005), na medida em que a sua ligação aos recetores H1 induz vasodilatação que leva à hiperemia e aumento da permeabilidade vascular que induz quemose (Leonardi, 1999; Abelson, Smith & Chapin, 2003). Está ainda envolvida na secreção de muco, migração de células inflamatórias, ativação celular e modulação da função das células T. A histamina produz assim no olho efeitos semelhantes àqueles que produz em outros órgãos do corpo (Bielory, 2006). A fase precoce dura cerca de 40 minutos após a exposição ao alérgénio (Irkec & Bozkurt, 2012).

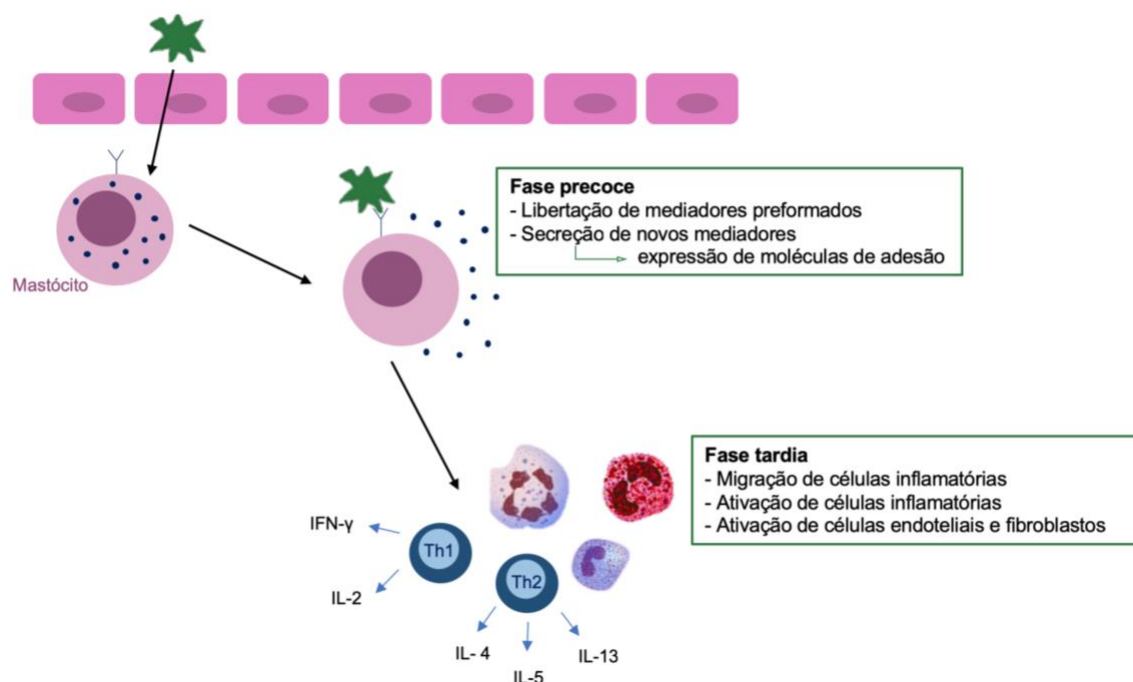
Numa segunda fase, os mastócitos secretam prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e citocinas que aumentam a permeabilidade vascular, induzindo vasodilatação, quimiotaxia e ativação de neutrófilos, eosinófilos e outras células inflamatórias, conduzindo assim à fase tardia (Leonardi, 2002; Chigbu, 2009). Das citocinas produzidas destacam-se a IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 e TNF- α que apresentam vários efeitos na mucosa conjuntival, nomeadamente a indução de quimiocinas e moléculas de adesão que contribuem para o recrutamento de células inflamatórias (Cook et al., 1998).

A fase tardia inicia-se 4 a 6 horas após a libertação dos mediadores preformados e os secretados de novo pelos mastócitos (Irkec & Bozkurt, 2012). Esta resposta é caracterizada pela ativação dos linfócitos T, pela produção de citocinas Th2 (Durham, 1998) e pela infiltração da conjuntiva por eosinófilos, neutrófilos e basófilos (Bonini et al., 1988). Os eosinófilos são marcadores da doença alérgica (Leonardi, Jose, Zhan & Calder, 2003).

Os diferentes mediadores libertados pelas células inflamatórias contribuem para a progressão dos sinais clínicos que caracterizam a conjuntivite alérgica crónica (Ono & Abelson, 2005). A fase tardia é assim um processo persistente que intensifica a expressão alérgica através de três mecanismos principais: 1) produção local de fatores libertadores de histamina; 2) ativação de células endoteliais e fibroblastos; e 3) diferenciação *in situ* de células inflamatórias (Leonardi, 1999). As células epiteliais da córnea e da conjuntiva e os fibroblastos contribuem para a construção deste processo na medida em que expressam e produzem citocinas, moléculas de adesão e fatores que mantêm a inflamação local e conduzem à remodelação tecidual (Leonardi, Curnow, Zhan & Calder, 2006).

Em síntese, a fase precoce é caracterizada pela presença de IgEs alérgénio-específicos associados à libertação de mediadores pelos mastócitos (Durham, 1998), enquanto que a fase tardia se caracteriza pelo elevado número de células inflamatórias que são atraídas para a conjuntiva (Bonini et al., 1988).

Figura 4 – Esquema ilustrativo da fase precoce e da fase tardia da alergia ocular (adaptado de Leonardi, 2013b).



4.2.1.1. Fator de necrose tumoral alfa

O $\text{TNF-}\alpha$, *tumor necrosis factor alpha*, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios (Aggarwal, Samanta, & Feldmann, 2000) mas também por células B, células T, células dendríticas, células endoteliais, osteoblastos, mastócitos e fibroblastos (Mo et al., 2011; Tizard, 2012).

Tem um papel importante na proteção contra as infeções bacterianas, estando também envolvido na modulação do crescimento celular, replicação viral, regulação do sistema imunitário, choque séptico, doenças autoimunes, artrite reumatoide, inflamação e diabetes

(Brynskov, Nielsen, Ahnfelt-Rønne & Bendtzen, 1994; Feldmann, Brennan, Elliott, Williams & Maini, 1995; Aggarwal et al., 2000).

A sua produção é induzida por várias citocinas, nomeadamente pela IL-1, IL-2 e interferões. Vírus, fungos, parasitas, protozoários, complexos imunes e células tumorais estimulam também a sua libertação. Por outro lado, são vários os agentes que inibem a sua libertação, tais como citocinas imunossupressoras (IL-4, IL-10 e IL-13) e antioxidantes. No geral, as citocinas produzidas por células Th2 têm um efeito negativo na expressão do TNF- α (Aggarwal et al., 2000).

É um mediador essencial da inflamação aguda (Echtenacher, Falk, Männel, & Krammer, 1990). Quando expostas a agentes infecciosos, as células sentinela sinalizam a ativação de genes que resultam na síntese e secreção de três citocinas principais: TNF- α , IL-1 e IL-6. Em combinação com a IL-1, o TNF- α desencadeia alterações nas células endoteliais vasculares induzindo a libertação de moléculas de adesão e quimiocinas que atraem os leucócitos circulantes (Tizard, 2012). O seu efeito quimiotático é também exercido sobre os eosinófilos e neutrófilos, mais uma vez, através de moléculas de adesão (Ming, Bersani & Mantovani, 1987).

O aumento no local da inflamação de TNF- α causa os sinais clássicos da inflamação: calor, inchaço, dor e rubor (Tizard, 2012).

Para além da sua importância na imunidade inata, participa na transição para a imunidade adquirida do tipo celular (Thomas, 2001).

Em Medicina Humana, são vários os estudos que tem vindo a ser desenvolvidos no sentido de esclarecer o papel do TNF- α em várias doenças alérgicas, como a rinite alérgica e a dermatite atópica. Apesar de não se conhecer ainda o mecanismo exato, demonstrou-se já que esta citocina tem um papel importante nestas doenças (Mo et al., 2011).

No olho, o TNF- α participa na fisiopatologia de doenças inflamatórias, edematosas e neurodegenerativas (Rodrigues et al., 2009). Os estudos sobre o seu papel na conjuntivite alérgica são escassos, mas sabe-se que na inflamação alérgica o TNF- α é necessário quer à produção de citocinas Th2 quer à migração de células inflamatórias para os locais da inflamação (Cohn, Homer, Marinov, Rankin & Bottomly, 1997; Artis et al., 1999). Esta citocina aumenta o influxo de células inflamatórias na mucosa conjuntival através da sobreexpressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Pober et al., 1986). Mais especificamente, pensa-se que esteja envolvido na quimiotaxia dos eosinófilos por aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos fibroblastos da córnea e da conjuntiva (Fukagawa et al., 1997; Cook et al., 1998; Kumagai, Fukuda, Ishimura & Nishida, 2000; Leonardi et al., 2003b). O TNF- α regula ainda positivamente os recetores específicos presentes à superfície dos mastócitos conjuntivais aos quais se ligam os anticorpos IgE (Stahl, Cook, Graziano & Barney, 1999). Subsequentemente, através de mecanismos dependentes

de IgE, os mastócitos e os macrófagos libertam $\text{TNF-}\alpha$, o qual amplifica os efeitos da interleucina 4 na produção destes anticorpos (Mo et al., 2011).

Em 1998, um estudo revelou níveis séricos de $\text{TNF-}\alpha$ significativamente mais elevados em pacientes com queratoconjuntivite vernal comparativamente aos pacientes controlo, (Leonardi, Borghesan, DePaoli, Plebani & Secchi, 1998). Leonardi et al. (2003a) demonstraram também a existência de níveis elevados de $\text{TNF-}\alpha$ na lágrima de pacientes com esta doença, sugerindo assim que esta citocina pró-inflamatória tem um papel importante na fisiopatologia da conjuntivite alérgica crónica.

4.2.1.2. Interleucina 6

A interleucina 6, citocina pró-inflamatória, tem um papel importante na inflamação (Wu et al., 2010; Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras & Rose-John, 2011), na resposta imunitária e na hematopoiese (Tanaka, Narazaki & Kishimoto, 2014). Na resposta imunitária adquirida esta interleucina estimula a produção de anticorpos (Kishimoto, 1989) e a proliferação de células T (Chigbu, 2009).

É produzida por diversas células incluindo células inflamatórias, como linfócitos B e T (Hirano et al., 1985), macrófagos, monócitos (Jia et al., 2011), neutrófilos (Hori et al., 1988) e não inflamatórias, nomeadamente fibroblastos (May, Helfgott, & Sehgal, 1986), miócitos, osteoblastos (Suchaoin et al., 2016), células endoteliais (Jirik et al., 1989) e queratinócitos (Kirnbauer et al., 1989).

A sua produção é desencadeada por endotoxinas bacterianas, IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ (Tizard, 2012). É inibida por citocinas Th2, designadamente pela IL-4 e IL-13 (te Velde, Huijbens, Heije, de Vries & Figdor, 1990; Minty et al., 1993), embora possa também ser estimulada pela IL-4 aquando da resposta humoral (Smeland, Blomhoff, Funderud, Shalaby & Espevik, 1989).

Os efeitos da interleucina 6 são sinérgicos aos das citocinas IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, e em conjunto mediam a inflamação aguda (Ghasemi, 2018).

Numa fase inicial, a IL-6 é sintetizada no local da inflamação e dirige-se, através da corrente sanguínea, ao fígado onde induz a produção de várias proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, Proteína C Reativa (Gauldie, Richards, Harnish, Lansdorp & Baumann, 1987), Fibrinogénio, Proteína Amilóide A Sérica e Haptoglobina (Heinrich, Castell & Andus, 1990).

Pensa-se que tenha um papel importante na fisiopatologia da dermatite atópica em humanos (DAh), uma vez que são vários os estudos que o demonstram. Por exemplo, Gharagozlou et al. (2013) verificaram um aumento significativo da frequência de um determinado alelo do gene da interleucina 6 em pacientes com DAh. Öztürk, Aral, Kurutaş & Çelik (2012) demonstraram valores séricos de IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$ mais elevados em crianças com DA do que em crianças saudáveis, assim como uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre estes valores e a severidade da doença, sugerindo assim a possibilidade destas interleucinas serem utilizadas como marcadores da DAh.

Em Medicina Humana está também já descrita a presença de níveis elevados de interleucina 6 em várias doenças oculares, nomeadamente em doenças autoimunes, no glaucoma, na queratite, na uveíte e na conjuntivite alérgica (De Vos, Hoekzema & Kijlstra, 1992; Zahir-Jouzani, Atyabi & Mojtavavi, 2017). Leonardi et al. (1998) demonstraram níveis elevados de IL-6 nas lágrimas e em biópsias conjuntivais de pacientes com queratoconjuntivite vernal comparativamente com pacientes controlo, sugerindo que existe uma produção local desta interleucina. Em 2006, um estudo que teve como objetivo medir diferentes citocinas em amostras de lágrimas de pacientes com conjuntivite alérgica sazonal, queratoconjuntivite vernal e queratoconjuntivite atópica revela valores elevados para a IL-6 nos três grupos, em comparação com o grupo controlo (Leonardi et al., 2006).

4.2.1.3. Interleucina 12

A interleucina 12 é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos, nomeadamente por macrófagos e células dendríticas, mas também por linfócitos B e neutrófilos (Esche, Shurin & Lotze, 2000; Tizard, 2012). É ainda produzida por células que não fazem parte do sistema imunitário como queratinócitos e osteoblastos (Hamza, Barnett & Bingyun, 2010).

A produção da IL-12 é regulada por mecanismos de feedback positivo e negativo que envolvem citocinas Th1 e citocinas Th2 (Aste-Amezaga, Ma, Sartori & Trinchieri, 1998). É inibida pela IL-10 (Koch et al., 1996), IL-4 (Snijders et al., 1996), IL-11 (Trepicchio, Bozza, Pedneault & Dorner, 1996), IL-13 (D'Andrea, Ma, Aste-Amezaga, Paganin & Trinchieri, 1995), e IFN tipo 1 (Cousens, Orange, Su & Biron, 1997).

Esta interleucina apresenta múltiplas funções biológicas, sendo considerada a ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Hamza et al., 2010). Assim, quando presente, induz a diferenciação das células T CD4⁺ em células Th1 e ativa as células NK. Após a ativação, estas células produzem IFN γ e outras citocinas tipo 1 (Esche et al., 2000). Na ausência da IL-12, a resposta imune passa de Th1 para Th2, devido à IL-4 (Tizard, 2012).

Promove a resistência a várias doenças infecciosas ao atuar como um adjuvante da vacinação, e é ainda caracterizada por ter um elevado poder anti-tumoral (Esche et al., 2000).

Em Medicina Humana sabe-se que a interleucina 12 participa em diversas doenças autoimunes como é o caso da uveíte autoimune, esclerose múltipla e artrite reumatoide, para as quais tem vindo a ser investigado ao longo dos anos a possibilidade de utilizar um agente que tenha como alvo a interleucina 12 para o tratamento destas doenças (el-Shabrawi, Livir-Rallatos, Christen, Baltatzis & Foster, 1998; Comabella et al., 1998; Pope & Shahrara, 2013). Alguns estudos sobre doenças alérgicas demonstram níveis de IL-12 mais baixos em pacientes com estas doenças do que em pacientes saudáveis. Segundo os mesmos estudos, estes resultados prendem-se com o facto de, ao potenciar a imunidade mediada por células, existir um aumento das citocinas Th1, sobretudo de IFN γ , que inibe a produção de IgE e o

recrutamento de eosinófilos associados a estas doenças (Gavett et al., 1995; Chung, 2001; Leonard & Sur, 2003).

Existem, contudo, resultados contraditórios. Zedan et al. (2015) revelaram no seu estudo valores séricos de IL-12 e IL-18 mais elevados em pacientes com DAh comparativamente com o grupo controlo, sugerindo ainda que há uma forte correlação entre estes valores e a gravidade da doença. Em 2008, um estudo em crianças com dermatite atópica revelou as mesmas conclusões para a interleucina 12 (Piancatelli, Bellotta, Del Beato, Duse & Della Penna, 2008). Magone et al. (2000) sugerem que a IL-12 é importante para o desenvolvimento da fase tardia da conjuntivite alérgica na medida em que a ausência desta durante o desenvolvimento das células T efectoras previne a infiltração celular característica da fase tardia.

4.2.1.4. Interleucina 10

Tendo em conta a escassez de estudos realizados no âmbito da CAc, nomeadamente na sua fisiopatologia, revela-se importante referir os resultados de um estudo anteriormente realizado no HEV-FMV que incidiu sobre a avaliação da expressão génica da IL-10 na CAc (Côrte-Real et al., 2015).

A IL-10 é uma citocina de resposta humoral que tem como função modular respostas do foro alérgico e inflamatório (Ghasemi et al., 2012). É produzida por macrófagos (Cavaillon, 1994), fibroblastos conjuntivais (Leonardi et al., 2006), linfócitos Th2 (Sano, Osawa, Sotozono & Kinoshita, 1998), linfócitos B (Ghasemi et al., 2012) e neutrófilos (Stumpf, Case, Shimeld, Easty & Hill, 2002). Apresenta vários estimuladores, como a IL-2, IL-12 e IFN α (Wanidworanun & Strober, 1993; Arman et al., 1996), e inibidores, IL-13, IL-4, TGF β , IFN γ e a própria IL-10 (Chomarat, Risoan, Banchereau & Miossec, 1993; de Waal Malefyt et al., 1993; Suberville et al., 2001; Yao, Li, Kaplan & Chang, 2005).

No que diz respeito à CA, a IL-10 atua como uma citocina anti-inflamatória e antiangiogénica, considerando-se importante para a regressão da doença (Ghasemi et al., 2012). Assim, esta regula a síntese de citocinas pelos mastócitos (Bundoc & Keane-Myers, 2007) e inibe a formação de neovasos ao nível da conjuntiva e da córnea (Ghasemi et al., 2012).

O referido estudo verificou que os níveis de expressão génica da IL-10 foram superiores nos animais com CA (n=10) comparativamente aos do grupo controlo (n=10), apesar da diferença não ser estatisticamente significativa (Côrte-Real et al., 2015).

CAPÍTULO III – Contribuição para a Caracterização Clínica e Imunológica da Conjuntivite Alérgica Canina

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA). Este faz parte do Projeto UID/CVT/276/2013, tendo sido financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) através do projeto “Estudo da resposta imunitária da conjuntivite alérgica canina.” (Projeto CIISA MIMV 5).

1. Objetivos

A conjuntivite alérgica é a causa mais frequente de conjuntivite em cães, ocorrendo frequentemente associada à DAc (Esson, 2015). Contudo, o conhecimento acerca da CAc sobretudo da sua fisiopatologia, é ainda muito incipiente. A necessidade de desenvolver estudos no sentido de aumentar o conhecimento desta doença, principalmente com vista ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, é imperativa.

Este estudo teve por objetivo contribuir para a caracterização clínica e imunológica da conjuntivite alérgica canina. Para isso, foi quantificada a expressão génica de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , e de uma citocina Th1, neste caso a IL-12, na conjuntiva de cães com sinais clínicos de CAc. Avaliaram-se quantitativamente os sinais clínicos da DAc e da CAc através da utilização de duas escalas apropriadas, de forma a averiguar a existência de uma correlação entre a gravidade das lesões e a expressão génica de cada uma das interleucinas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra em estudo

Da amostra em estudo fizeram parte 41 canídeos acompanhados no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária – ULisboa, os quais formaram dois grupos distintos: grupo controlo, constituído por 21 canídeos saudáveis, e grupo experimental, constituído por 20 canídeos com conjuntivite alérgica e dermatite atópica diagnosticados e acompanhados no serviço de Oftalmologia e/ou Dermatologia do mesmo hospital.

2.2. Critérios de seleção da amostra

Um dos critérios de inclusão comum a ambos os grupos foi a autorização, por escrito, dos tutores para que os animais pudessem integrar o estudo (Anexo III).

Os animais do grupo controlo foram selecionados ao acaso, independentemente da raça, sexo e idade. O critério de inclusão neste grupo foi a ausência de doenças oftálmicas ou

dermatológicas que invalidassem a participação no estudo, tendo sido para isso avaliada a sua história pregressa e realizado um exame oftálmico.

Para o grupo experimental, designado de grupo atópico, foram selecionados animais diagnosticados concomitantemente com CAC e DAC no HEV - FMV, no período compreendido entre setembro de 2017 e abril de 2018. Os critérios de inclusão e exclusão para a amostra em estudo encontram-se sumarizados na tabela a seguir:

Tabela 3 - Critérios de inclusão e exclusão para a amostra em estudo.

Critérios de inclusão
<ul style="list-style-type: none">▪ Diagnóstico de DAC e CAC;▪ Ausência de outras doenças oftálmicas e/ou dermatológicas;▪ Autorização dos tutores.
Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none">▪ Imunoterapia nos 6 meses precedentes ao estudo;▪ Tratamento com anti-histamínicos nos 14 dias precedentes ao estudo;▪ Tratamento com ciclosporina A ou glucocorticoides, orais ou tópicos, nas 3 semanas precedentes ao estudo;▪ Tratamento com lokivetmab no mês precedente ao estudo;▪ Tratamento com oclacitinib nos 7 dias precedentes ao estudo;▪ Administração parentérica de glucocorticoides nas últimas 8 semanas;▪ Animal em cio ou gestante;▪ Animal com desequilíbrios eletrolíticos.

2.3. Avaliação dermatológica

Os animais diagnosticados com DAC foram submetidos a um exame dermatológico no qual se utilizou o sistema de classificação *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version* (CADESI-04) (Anexo IV). Este tem como objetivo avaliar quantitativamente a gravidade das lesões cutâneas existentes.

Assim, avaliaram-se 21 regiões anatômicas quanto à presença de eritema, liquenificação, escoriações e/ou alopecia, atribuindo-se um valor numa escala de 0 a 3, em que 0 é a ausência de qualquer lesão. Considerando a importância de avaliar os sinais clínicos na região periocular no presente estudo, foi adicionada esta região à escala original.

De acordo com o score total obtido e considerando apenas as 20 regiões anatômicas pré-definidas classificou-se a DAC em ligeira (10-34), moderada (35-59) ou grave (>60) (Olivry et al., 2014).

2.4. Avaliação oftalmológica

Elaborou-se uma ficha para cada um dos animais que integrou o estudo, na qual se registaram os resultados do exame oftalmológico completo realizado a cada um deles (Anexo V), que incluiu várias etapas, nomeada e ordenadamente:

- 1) Observação externa dos olhos, pálpebras e estruturas perioculares com recurso a um foco de luz;
- 2) Avaliação da resposta de ameaça e dos reflexos palpebral, corneano, pupilar direto e consensual, de ambos os olhos;
- 3) Realização do TS (Schirmer Tear Test Strips; Eickemeyer, Sunbury-on-Thames, Reino Unido) de modo a avaliar a produção lacrimal, sendo considerados normais os valores entre 15 mm/min e 25 mm/min (Alkan, Izci, Tepeli & Koc, 2004);
- 4) Medição tripla e consecutiva da PIO de cada olho com o tonómetro TonoVet® (Kruuse; Dinamarca). Pressões entre 15 mm Hg e 25 mm Hg foram consideradas normais (Gelatt & MacKay, 1998);
- 5) Biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa SL15; Tóquio, Japão) em condições de luminosidade reduzida.
- 6) Fundoscopia com recurso a um oftalmoscópio direto (PanOptic™ Ophthalmoscope, Welch Allyn®; Skaneateles Falls, E.U.A.) em condições de luminosidade reduzida.

Para o grupo atópico a etapa 5) permitiu a identificação e avaliação quantitativa da gravidade dos sinais clínicos da CAC (hiperemia conjuntival, prurido, quemose, corrimento ocular, epífora e queratite concomitante), através da atribuição de um valor entre 0 (ausente) e 3 (grave). A soma destes valores permitiu obter um *score* total que variou entre 0 e 18.

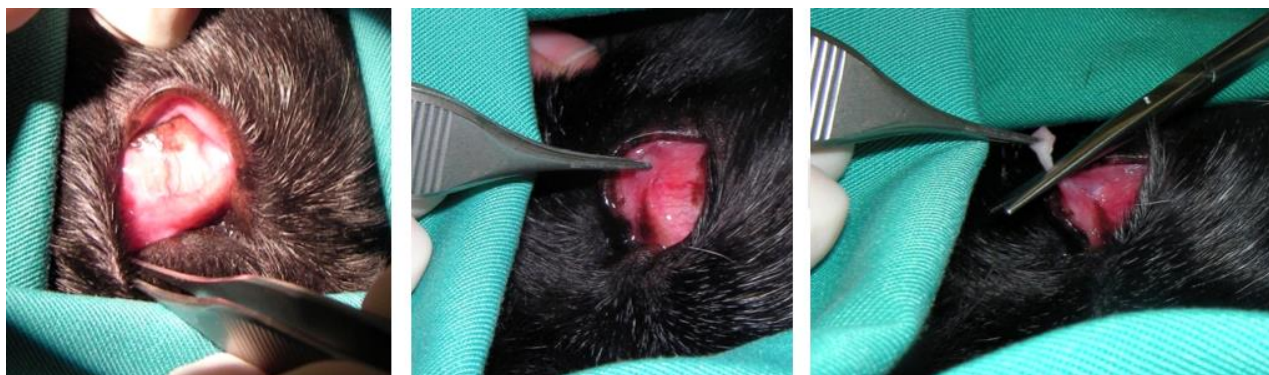
O grau de prurido foi atribuído com base na descrição realizada pelos tutores quando questionados acerca da presença, nos seus animais, de determinados comportamentos característicos da manifestação de prurido, nomeadamente coçar e/ou esfregar a região periocular, e nas lesões cutâneas características deste sinal clínico.

2.5. Colheita de amostras

Realizaram-se, no âmbito do estudo, um total de 41 biópsias de conjuntiva canina.

Inicialmente aplicaram-se duas gotas de colírio anestésico (Cloridrato de oxibuprocaina, Anestocil®, Edol, Portugal) na superfície conjuntival da qual se pretendeu recolher a amostra, com intervalos de 5 minutos entre si. No fundo de saco conjuntival e numa área pouco vascularizada, destacou-se, com o auxílio de uma pinça, a porção de conjuntiva a seccionar. Com recurso a uma tesoura de tenotomia procedeu-se à secção de uma amostra com a dimensão aproximada de 3x3 mm (Figura 5). Cada amostra assim obtida foi colocada individualmente em microtubos com RNAlater® (Qiagen, Alemanha), uma solução de estabilização e proteção do ácido ribonucleico (RNA), e posteriormente armazenada a -20°C até à sua utilização.

Figura 5 - Biópsia de conjuntiva passo-a-passo obtida a partir do fórnix conjuntival inferior (Fotografias originais).



2.6. Processamento de amostras

2.6.1. Extração de RNA

A extração do RNA total a partir das amostras de conjuntiva foi efetuada com o *RNEasy® Mini Kit* (Qiagen GmbH; Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Assim, começou-se por colocar cada amostra num microtubo de 2 mL, à qual se juntou um volume de 350 μ L de *Buffer RLT Plus* e uma esfera metálica esterilizada. A lise celular e a homogeneização do tecido foram realizadas mecanicamente no *TissueLyser II* (Qiagen) com um ciclo de 2 minutos a 25 Hz. O lisado foi posteriormente centrifugado à velocidade máxima durante 3 minutos e o sobrenadante obtido transferido para um novo microtubo, ao qual se adicionou 350 μ L de etanol a 70%. A mistura assim obtida foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 8 000 x g durante 15 segundos e descartou-se o filtrado. Adicionou-se à coluna 700 μ L de um tampão de lavagem (*RW1*), seguida de uma nova centrifugação nas mesmas condições. Repetiu-se o processo de lavagem com outro tampão (500 μ L de *RPE*). Por fim, eluiu-se o RNA da coluna através da adição de 50 μ L de *RNase-Free Water* e uma nova centrifugação a 8 000 x g durante 1 minuto. Descartou-se a coluna e conservou-se o eluído.

2.6.2. Tratamento com DNase

Após a extração do material genético foi feita a degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico concomitante através *DNase I, Amplification Grade* (Invitrogen; Van Allen Way, E.U.A.), de acordo com as instruções do fabricante:

- 1) Adicionar 1 μ L de tampão de reação da DNase 10x e 1 μ L de DNase livre de RNase;
- 2) Aquecer a solução a 37°C durante 1 hora;
- 3) Adicionar 1 μ L de EDTA;
- 4) Aquecer a 65°C durante 15 minutos;
- 5) Colocar em gelo.

A concentração e a pureza do RNA obtido para cada amostra foram determinadas por espectrofotometria através do aparelho *Nanodrop™* 2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, E.U.A.), com os comprimentos de onda de 260nm e 280nm.

2.6.3. Síntese de DNA complementar

A síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi efetuada através do *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Foi reversamente transcrito 250ng de RNA total, após determinação da concentração de cada amostra determinada anteriormente. Ao RNA total adicionou-se 1 µL de *primers Oligo (dT)₁₈* e água esterilizada de forma a perfazer o volume de 13 µL para cada amostra. No termociclador (VWR), estas misturas foram sujeitas a 65°C durante 10 minutos e imediatamente arrefecidas em gelo. De seguida, adicionou-se a cada um dos microtubos os seguintes reagentes e respetivos volumes, pela ordem com que são mencionados: 4 µL de *Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer* 5x, 0.5 µL de *Protector RNase Inhibitor* 40 U/µL, 2 µL de *Deoxynucleotide Mix* 10 mM e 0.5 µL de *Transcriptor Reverse Transcriptase* 20 U/µL. Cada solução, em cada tubo de reação, fez assim o volume final de 20 µL que foi sujeito, no termociclador, a 55°C durante 30 minutos, seguida de 5 minutos a 85°C, sendo por fim arrefecidas a 4°C.

Todas as amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até serem amplificadas por reação de polimerização em cadeia quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

2.6.4. Seleção dos *primers*

Para o qRT-PCR é necessário quantificar, paralelamente ao gene em estudo, um gene constitutivo que permita padronizar as amostras. Em estudos anteriores estudaram-se vários genes constitutivos quanto à consistência nos resultados e características da reação, tendo-se optado pelo da proteína ribossomal L27 (RPL27) por ter demonstrado melhores resultados. Desta forma, foi este o gene constitutivo escolhido para o presente estudo. Os *primers* do gene do RPL27 e das interleucinas, IL-6, TNF-α e IL-12, foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Luísa Mateus (FMV-UL).

Todos os *primers* utilizados neste estudo apresentaram uma eficiência superior a 90% pelo que permitiram a utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados no qRT-PCR.

Gene	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'
RPL27	TCG TCA ACA AGG ATG TCT TCA GAG	TCT TGC CAG TCT TGT ACC TCT CCT
IL-6	CTG GCA GGA GAT TCC AAG GAT	TCT GCC AGT GCC TCT TTG C
TNF-α	TGA CAA GCC AGT AGC TCA TGT T	CGG CAA AGT CCA GAT AGT TAG G
IL-12	CAG CAG AGA GGG TCA GAG TGG	ACG ACC TCG ATG GGT AGG C

2.6.5. PCR quantitativa em tempo real

A avaliação da expressão das citocinas foi efetuada por PCR quantitativo, recorrendo-se ao equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Califórnia, E.U.A.) e a placas de 96 poços (BIOplastics, Landgraaf, Holanda).

Para cada gene foi preparada uma solução com 10 µL de SensiFast™ SYBR® Hi-ROX mix, 2 µL de *primer forward* 1 nM, 2 µL de *primer reverse* 1 nM e 4 µL de água filtrada por Milli-Q (Millipore Corporation), perfazendo assim um volume total de 18 µL. Cada uma destas soluções foi distribuída pelos diferentes poços da placa, adicionando-se posteriormente 2 µL do cDNA anteriormente sintetizado em cada poço, à exceção dos poços correspondentes aos controlos negativos. A avaliação das amostras e dos controlos negativos foi realizada em duplicado.

O esquema de amplificação consistiu numa fase inicial de desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 90°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Os resultados obtidos foram avaliados com recurso ao *StepOnePlus Software v2.3* (Thermo Fisher Scientific), e exportados para *Microsoft® Excel 16.14.1*.

O aparelho mede a fluorescência emitida pelo SYBR *Green* ligado a DNA de cadeia dupla. Quanto mais amplificado se obtiver na amostra, mais precocemente se deteta a sua presença, determinando-se o *threshold cycle* (Ct). A quantificação relativa de cDNA é um método indireto de avaliar a expressão de mRNA, sendo que quanto menor for o Ct, maior a expressão do gene em estudo. Assim, a expressão génica das citocinas, avaliada através de quantificação relativa, baseia-se nos níveis de expressão do gene alvo *versus* gene constitutivo. O método utilizado para esta quantificação relativa é o $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O primeiro passo consiste na padronização, para cada animal, da expressão de um gene usando como referência o RPL27. Este valor é o ΔCt e calcula-se através da diferença entre a amplificação do mRNA do gene das diferentes citocinas de cada amostra individual e a amplificação do mRNA do gene constitutivo dessa mesma amostra:

$$\Delta Ct = Ct (gene\ alvo) - Ct (gene\ housekeeping)$$

No passo seguinte calcula-se o $\Delta\Delta Ct$ que representa a diferença entre o ΔCt das amostras do grupo controlo e o ΔCt das amostras do grupo atópico:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (amostras\ controlo) - \Delta Ct (amostra\ grupo\ atópico)$$

A última etapa permite converter o $\Delta\Delta Ct$ em valores que se consigam interpretar facilmente. Em cada ciclo do termociclador, cada cadeia de DNA pode ou não dar origem a outra igual, consoante a eficiência da reação. Sabendo que a eficiência varia entre 0 e 1, o número de cadeias de DNA de um ciclo para o ciclo seguinte será múltiplo de $1 + \text{Eficiência da reação}$. Pressupondo a eficiência máxima para esta reação, a quantidade de DNA duplica a cada

ciclo: $\text{Quantidade inicial de cDNA} \times (1+1)$. Ao fim de n ciclos, a quantidade de DNA será igual a: $\text{Quantidade inicial de cDNA} \times 2^n$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Para a quantificação relativa de um grupo em relação ao outro aplica-se este fundamento teórico, e transforma-se o valor de $\Delta\Delta C_t$ obtido utilizando a seguinte expressão: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este valor indica-nos quantas vezes maior ou menor é a expressão do gene em estudo no grupo atópico relativamente ao grupo controlo.

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi elaborada com a colaboração do Professor Doutor Telmo Nunes (FMV-UL), sendo a análise dos dados obtidos feita com recurso ao programa *R Commander* 3.5.0.

Para os resultados de qRT-PCR, começou-se por analisar a distribuição das variáveis em estudo através do teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Os valores de expressão da IL-6, TNF- α e IL-12 apresentaram uma distribuição normal, utilizando-se assim o *Welch Two Sample t-test* para testar a diferenciação entre o grupo atópico e controlo.

A correlação entre a expressão das interleucinas e o score de CA foi avaliada através do teste de correlação de Spearman, tendo-se procedido da mesma forma relativamente aos valores de CADESI-04.

Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95%, pelo que apenas valores de *p-value* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

CAPÍTULO IV – Resultados

1. Caracterização da amostra

Da amostra em estudo fizeram parte 41 canídeos divididos em dois grupos, um controlo com 21 canídeos e outro experimental com 20 canídeos (Anexo VI).

Dos 21 canídeos que compõem o grupo controlo, 10 eram machos e 11 eram fêmeas. As idades variaram entre 1 e 12 anos, sendo a média de $5,2 \pm 3,7$ anos. Relativamente à raça, a distribuição foi de quatro animais *Pincher*, dois *Retriever* do Labrador, dois *Border Collie*, dois Pastor Alemão, um Malamute do Alasca, um *Schnauzer*, um *Chihuahua*, um *Yorshire Terrier*, um Serra da Estrela, um *Cocker Spaniel*, um Bichon Maltês, um Pastor Australiano e três animais de raça indeterminada.

No que diz respeito ao grupo atópico, 9 eram machos e 11 eram fêmeas. As idades variaram entre 1 e 12 anos, sendo a média de $5 \pm 3,1$ anos. Relativamente à raça, a distribuição foi de dois animais Bouledogue Inglês, dois Bouledogue Francês, dois *Cocker Spaniel*, dois *Shih Tzu*, um *Retriever* do Labrador, um Dogue de Bordéus, um *Weimaraner*, um *American Staffordshire Terrier*, um Boxer, um Pastor Alemão, um *Border Collie*, um Cão de Água Português, um *Yorshire Terrier*, um *Pug* e dois animais de raça indeterminada.

2. Avaliação oftalmológica

Todos os animais foram submetidos a um exame oftálmico completo, sendo uma das etapas criteriosas para a integração destes no estudo (Anexo VII). Nenhum dos exames oftálmicos revelou sinais oculares que invalidassem a sua participação no mesmo.

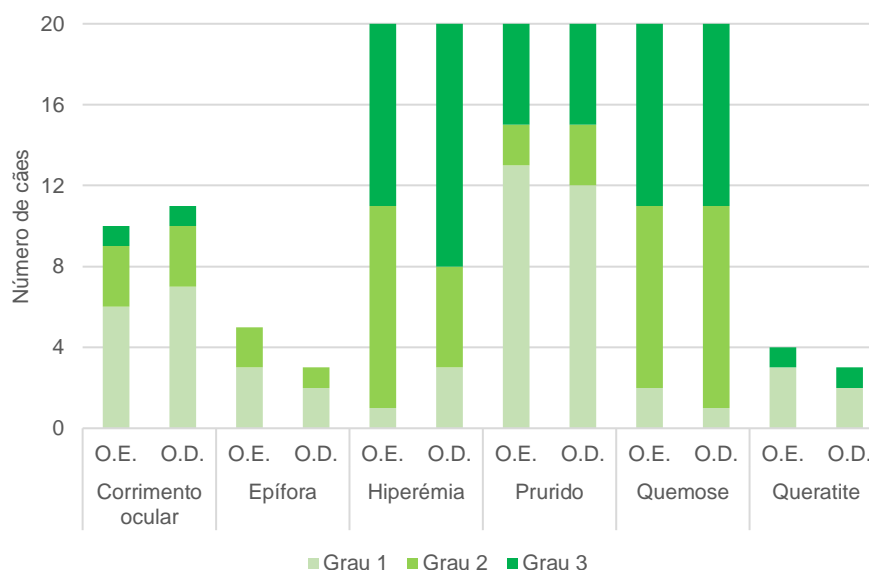
Durante o exame oftalmológico e recorrendo à biomicroscopia avaliou-se quantitativamente a gravidade dos sinais clínicos de CAC, obtendo-se uma classificação ocular final (*score* de CA) para cada animal do grupo atópico (Anexo VIII). A média \pm desvio padrão dos *scores* de CA referente ao olho esquerdo, direita e de ambos os olhos foi, respetivamente, $7,75 \pm 1,97$; $7,65 \pm 2,21$ e $7,70 \pm 1,98$.

A sintomatologia ocular foi predominantemente assimétrica ($n=14$) em comparação com o número de quadros simétricos ($n=6$). A diferença de *scores* entre os dois olhos variou em média um valor. Não se observou nenhum quadro de sintomatologia ocular unilateral.

Os sinais oculares mais observados foram a hiperemia conjuntival, prurido e quemose, com 100% de prevalência, seguindo-se, por ordem decrescente, o corrimento ocular (55%), epífora e queratite concomitante (25%).

No Gráfico 2 é apresentado, para cada um dos sinais oculares, o número de pacientes que manifestam grau 1 (ligeiro), grau 2 (moderado) e grau 3 (grave) em cada olho.

Gráfico 2 - Distribuição e gravidade dos sinais clínicos de CAC para o olho esquerdo (O.E.) e direito (O.D.).



3. Avaliação dermatológica

Com o intuito de avaliar a relação entre a expressão génica das interleucinas e os sinais dermatológicos foi necessário avaliar quantitativamente a gravidade desta sintomatologia, recorrendo-se para isso ao sistema de classificação CADESI-04, já referido anteriormente (Anexo IX).

A média \pm desvio padrão dos scores lesionais foi igual a $32,35 \pm 10,64$.

Com base nos CADESI-04 obtidos classificou-se a doença em ligeira, moderada e grave, tendo em conta os intervalos de classificação de Olivry et al., 2014. Para esta classificação foram considerados apenas as 20 regiões anatómicas pré-definidas, excluindo-se a região periocular adicionada à escala neste estudo. Assim, a amostra em estudo apresenta 13 casos de DA ligeira (65%), 7 casos de DA moderada (35%) e nenhum caso de DA grave.

4. Avaliação da expressão das interleucinas por qRT-PCR

No fim da qRT-PCR e para garantir que houve uma correta amplificação nesta, avaliou-se a temperatura de dissociação e posteriormente em gel de agarose a dimensão do amplificado. Os resultados foram analisados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que permite representar a expressão de um gene nos animais com conjuntivite alérgica relativamente aos animais do grupo controlo. Assim, o valor em *folds* expressa quantas vezes maior ou menor é a expressão nos animais atópicos.

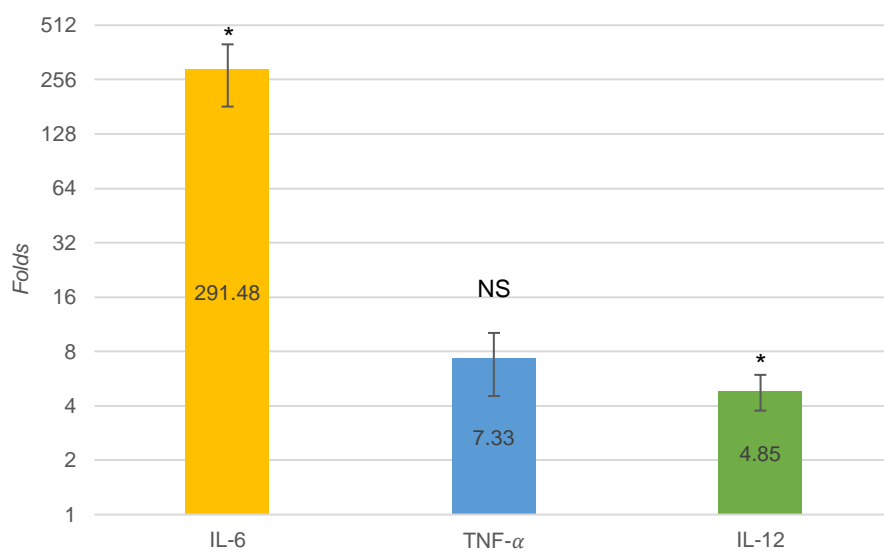
Pela análise dos ΔCt determinou-se que as amostras dos animais com conjuntivite alérgica têm em média 291.48 ± 109.96 *folds*, ou seja, o grupo atópico expressa 291.48 ± 109.96 vezes

mais o gene da IL-6 do que o grupo controlo. A diferença entre os dois grupos foi analisada com o *Welch Two Sample t-test*, e demonstrou ser estatisticamente significativa ($p=1.306e-09$).

A expressão média de TNF- α também parece estar aumentada (7.33 ± 2.80 folds), mas a diferença entre os dois grupos não é estatisticamente significativa ($p= 0.18$) e poderá deste forma ser interpretada com devida ao acaso.

Por outro lado, os resultados indicam que é detetado mais mRNA de IL-12 nos canídeos com conjuntivite alérgica do que no grupo controlo (4.85 ± 1.09 folds), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p= 0.00033$).

Gráfico 3 - Quantificação relativa da expressão das citocinas nos animais com conjuntivite alérgica relativamente aos animais controlo.



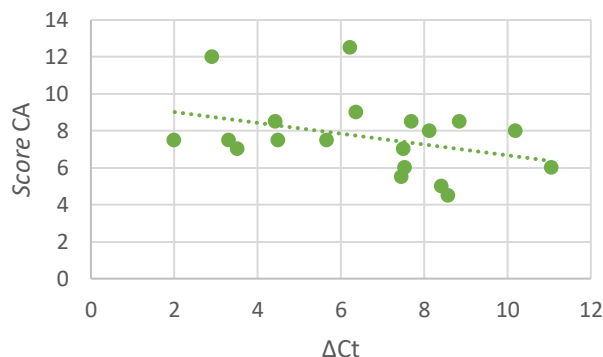
* $p < 0,001$; NS: Diferença não estatisticamente significativa.

5. Coeficiente de correlação entre variáveis

5.1. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 e o score de CA

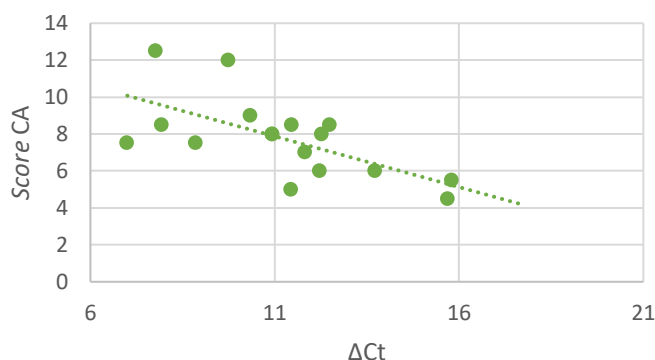
Para o grupo dos animais com conjuntivite alérgica, comparou-se a expressão de IL-6 com o a média do score de CA de ambos os olhos, contudo não foi possível demonstrar a existência de correlação entre as variáveis analisadas ($Rho=-0.28$; $p=0.24$).

Gráfico 4 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de IL-6 na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.



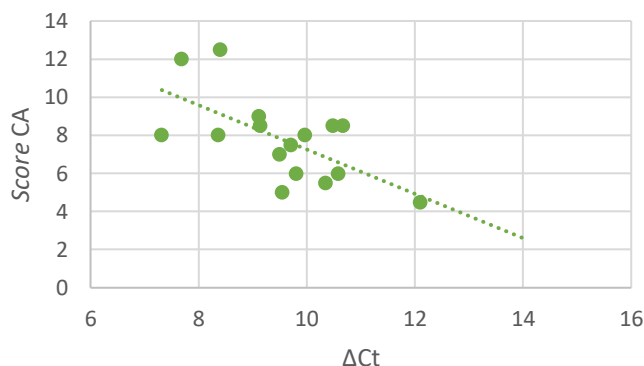
No que diz respeito à TNF- α , o teste de correlação de Spearman revelou que existe uma correlação negativa entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de TNF- α e o score de CA, sendo esta relação estatisticamente significativa ($Rho=-0.57$; $p=0.02$).

Gráfico 5 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de TNF- α na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.



Verificou-se também uma correlação negativa e estatisticamente relevante entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de IL-12 e o score de CA ($Rho=-0.50$; $p=0.049$).

Gráfico 6 - Correlação entre os valores de ΔCt correspondentes à expressão de IL-12 na conjuntiva dos animais atópicos e o score de CA.



Para as três interleucinas, o declive da reta de regressão assume um valor negativo, o que sugere que quanto menor o ΔCt maior será score de CA. Assim, um animal com um score de CA igual a 10 terá, segundo esta relação, maior expressão génica de IL-12 do que um animal

com um *score* igual a 6. Considerando o teste de correlação de Spearman pode-se assumir que esta relação é estatisticamente relevante apenas para a TNF- α e IL-12.

5.2. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 e o CADESI-04

De seguida, equacionou-se a existência de uma correlação entre os níveis de expressão das três interleucinas e as lesões dermatológicas avaliadas quantitativamente através do CADESI-04. Assim, comparou-se a expressão de IL-6, TNF- α e IL-12 com o *score* total dos animais do grupo atópico, não tendo sido possível demonstrar a existência de correlação entre as variáveis analisadas ($p=0.90$; $p=0.92$; $p=0.72$, respetivamente).

CAPÍTULO V – Discussão

A conjuntiva é um local onde podem ocorrer processos inflamatórios complexos em indivíduos atópicos devido à sua vasta vascularização e população de mastócitos residentes (Gamache et al., 1997). A conjuntivite alérgica é uma doença ocular geralmente comparada e associada a outras doenças alérgicas como rinite alérgica e dermatite atópica (Ngoc, Gold, Tzianabos, Weiss & Celedón, 2005).

Embora não se conheça exatamente a sua prevalência, pode afirmar-se que esta é a causa mais comum de conjuntivite em cães, em detrimento de causas infecciosas (Esson, 2015). Tem-se vindo a demonstrar que a sua presença é muitas vezes pouco valorizada pelos médicos veterinários, e, portanto, subdiagnosticada (Lourenço-Martins et al., 2011).

1. Caracterização da amostra em estudo

Considerando que o grupo experimental é constituído apenas por cães com DA, faz sentido discutir as características da amostra tendo em conta o padrão clínico desta doença. Deste grupo fazem maioritariamente parte cães de raça definida, o que vai ao encontro do que é descrito por diferentes autores (Hillier & Griffin, 2001; Favrot, 2009; Jaeger et al., 2010). Grande parte destas raças estão descritas na literatura como sendo predispostas para o desenvolvimento da DAc (Griffin & DeBoer, 2001), podendo destacar-se as que surgiram com maior frequência, Bouledogue Inglês, Bouledogue Francês, *Cocker Spaniel* e *Shih Tzu*. Segundo vários autores, não existe uma predisposição de género para esta doença (Favrot, 2009; Bizikova et al., 2015b), o que se verificou também neste estudo, já que a distribuição de fêmeas e machos foi equilibrada.

Relativamente à idade, esta variou entre 1 e 12 anos, contudo o início dos sinais clínicos da DAc ocorreu antes dos 3 anos de idade, o que está de acordo com os critérios de Favrot (Favrot et al., 2010). Pode afirmar-se que, para a maioria dos animais, os primeiros sinais clínicos se manifestaram no primeiro ano de vida. Quando questionados, grande parte dos tutores expressou o início dos sinais clínicos de DAc do seu animal como uma realidade que esteve sempre presente desde que se lembram.

Relativamente ao início dos sinais clínicos de CAc, apenas foi possível obter esta informação, quer questionando os tutores quer através das fichas clínicas, para 8 dos animais que constituíram o grupo atópico. Para estes, os sinais clínicos de CAc surgiram ao mesmo tempo que o quadro clínico de DAc ou manifestaram-se ligeiramente mais tarde (menos de um ano de diferença). Em 2 dos animais os sinais clínicos oculares precederam o quadro dermatológico.

Os sinais clínicos da CAc são geralmente bilaterais, o que se comprovou em todos os animais que constituíram o grupo atópico. Observaram-se quadros clínicos idênticos em ambos os olhos, apesar de, considerando os scores de CAc obtidos, a sintomatologia ocular ser

predominantemente assimétrica. A diferença de *scores* entre os dois olhos variou, em média, apenas um valor. Os resultados relativos à avaliação oftalmológica estão de acordo com a literatura existente, considerando que o quadro clínico da CA é bilateral, mas podem ocorrer formas assimétricas (Leonardi et al., 2017).

O prurido, presente em todos os animais que constituíram o grupo atópico, é o sinal clínico mais importante na CAC tendo em conta que a sua ausência exclui esta doença (Ono & Abelson, 2005; Leonardi et al., 2012). É muitas vezes difícil de avaliar, uma vez que os tutores não associam certos comportamentos do seu animal à presença de prurido, como esfregar a face em objetos ou nos próprios tutores, ou coçar os olhos com recurso às extremidades podais. Assim, é importante questioná-los acerca destes comportamentos. Para além disso, o prurido pode ser avaliado através de sinais indiretos como escoriações e alopecia periocular (Favrot, 2009).

Em conjunto com o prurido, a hiperemia conjuntival e a quemose foram os três sinais oculares com maior prevalência nestes animais. Estes resultados são coincidentes com outros estudos anteriores (Lourenço-Martins et al., 2011; Côrte-Real et al., 2015), o que acentua a importância desta tríade. Outros sinais clínicos, como corrimento ocular, epífora e queratite, também eles descritos na literatura, puderam ser observados embora com menor frequência.

2. Avaliação da expressão do gene de IL-6, TNF- α e IL-12 na conjuntivite alérgica canina

Os estudos que se debruçam sobre a fisiopatologia das alergias oculares são em número reduzido, mesmo em Medicina Humana (Groneberg, Bielory, Fischer, Bonini & Wahn, 2003). Na presença de um alérgeno, as células T *helper* diferenciam-se em dois tipos clássicos, células Th1 e células Th2, caracterizadas pelo painel de citocinas que cada tipo secreta (Luckheeram, Zhou, Verma & Xia, 2012). As células Th1 promovem a imunidade celular enquanto que as Th2 estimulam a imunidade humoral que conduz à ativação da cascata dos eosinófilos e à produção de IgEs necessárias ao desenvolvimento da inflamação alérgica (Mosmann & Coffman, 1989). Durante este processo, algumas citocinas Th1 e Th2 parecem ser sobreexpressas (Irkec & Bozkurt, 2012). São vários os artigos que referem um papel dominante das citocinas Th2 na fisiopatologia da conjuntivite alérgica. Outros defendem que não existe um perfil Th1 ou Th2 definido, afirmando mesmo que existe uma correlação positiva entre ambos. Assim, pode afirmar-se que são várias as citocinas Th1 e Th2 importantes na CA, envolvidas em interações complexas entre elas em vez de em vias distintas e paralelas (Nivenius, Montan, Chryssanthou, Jung, van Hage-Hamsten & van der Ploeg, 2004).

Tem sido evidente a necessidade de desenvolver novos fármacos para o tratamento da conjuntivite alérgica.

A concentração e distribuição de mediadores inflamatórios no filme lacrimal têm sido um dos focos de alguns estudos sobre CAh no sentido de encontrar um “marcador da doença” para que se possa compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos envolvidos e identificar

potenciais alvos terapêuticos (Enríquez-de-Salamanca, Bonini & Calonge, 2012). Nesse sentido, têm sido testados vários fármacos com ação, por exemplo, de inibir a liberação de mediadores inflamatórios, contudo, até então ainda nenhum mostrou ser eficaz no tratamento da CAh (Ozaki, Seki, Fukushima & Kubo, 2005).

Posto isto, e considerando o pouco que se sabe acerca da fisiopatologia da CAc, foi possível com este estudo quantificar os níveis de expressão de mRNA de três potenciais interleucinas envolvidas neste processo, duas delas classificadas como citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e a outra como uma citocina da resposta celular (IL-12).

Foi possível identificar um aumento significativo dos níveis de IL-6 nos animais diagnosticados com CA. Em Medicina Humana, vários estudos verificaram níveis elevados desta interleucina nos diferentes tipos de CAh. Em 1998, Leonardi et al. sugerem que a produção local de IL-6 tem um papel importante no desenvolvimento da fase aguda da queratoconjuntivite vernal, considerando os níveis avaliados na lágrima e na conjuntiva.

Tal com a IL-6, também o TNF- α aparenta ter um papel na fisiopatologia da CA na medida em que diferentes estudos indicam um aumento dos níveis desta interleucina em pacientes com CA comparativamente com indivíduos saudáveis (Wakamatsu et al., 2010). Em 1999, Vesaluoma et al. desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar os níveis desta interleucina em lágrimas de pacientes atópicos, antes e após provocação alérgica conjuntival. Os resultados demonstraram maiores concentrações nos indivíduos com CAh comparativamente aos saudáveis.

No presente estudo verificou-se uma maior expressão de TNF- α nos cães do grupo atópico apesar da diferença de expressão entre os dois grupos não ser estatisticamente significativa. A expressão desta interleucina é igual ou superior na conjuntiva dos animais atópicos, relativamente à observada na conjuntiva dos animais saudáveis, ou seja, os níveis de expressão observados para o grupo atópico não se afastam significativamente daqueles observados para o grupo controlo. Considerando que o TNF- α é um mediador da inflamação aguda, aparecendo muito precocemente neste processo supõe-se que possa ser esta a razão para não se ter encontrado uma maior expressão génica desta interleucina. Sabe-se que está aumentado nas lágrimas pelo menos até 30 minutos após a exposição ao alérgeno, não se sabendo em que momento ocorre a segunda elevação dos níveis do TNF- α durante a fase tardia (Vesaluoma et al., 1999). O recurso a uma maior amostragem seria benéfico para clarificar estes resultados.

Assim, o aumento de citocinas pró-inflamatórias na conjuntivite alérgica sazonal, na queratoconjuntivite vernal e na queratoconjuntivite atópica, incluindo a IL-6 e TNF- α , é descrito por vários autores (Leonardi, Borghesan, DePaoli, Plebani & Secchi, 1998; Leonardi et al., 2006). Ambas são consideradas mediadores primários na resposta inflamatória aguda (Leonardi et al., 1998). Para além de outras funções, promovem a expressão de moléculas de adesão e secreção de quimiocinas pelos queratócitos corneais, fibroblastos conjuntivais e

células epiteliais, que contribuem para o recrutamento de células inflamatórias e indução da fase tardia da CA (Leonardi, 2013b). Assim, estas duas interleucinas essenciais na resposta imunitária inata são fundamentais quer na fase precoce quer na fase tardia da CAC. São ainda importantes na imunidade humoral uma vez que estimulam a produção de citocinas Th2 (Kishimoto, 1989; Cohn, Homer, Marinov, Rankin & Bottomly, 1997; Artis et al., 1999)

É ainda relevante fazer referência a estudos realizados com o intuito de avaliar o papel destas interleucinas na DA, especialmente aqueles realizados em Medicina Veterinária.

Majewska et al., 2016 verificaram elevadas concentrações de TNF- α em plasma de cães atópicos comparativamente com animais saudáveis. A secreção excessiva desta interleucina está associada à suscetibilidade para doenças do foro alérgico (Stanley & Lacy, 2010). Também em 2002, Nuttall, Knight, McAleese, Lamb & Hill observaram uma maior expressão génica de TNF- α em amostras de pele recolhidas de lesões de cães atópicos comparativamente às biópsias dos animais saudáveis.

Em 1993, verificou-se que células T isoladas de pacientes humanos com DA produzem espontaneamente elevados níveis de IL-6 comparativamente a indivíduos saudáveis ou com outras doenças inflamatórias. Estes achados sugerem que a IL-6 possa contribuir para a inflamação na DA (Toshitani, Ansel, Chan, Li & Hanifin, 1993).

Os resultados dos níveis de expressão da IL-12 revelaram ser 4.85 vezes superiores no grupo atópico relativamente ao grupo controlo, o que sugere o envolvimento de uma resposta do tipo Th1 na CAC. No que diz respeito ao papel desta interleucina em doenças do foro alérgico, os estudos são algo contraditórios. Enquanto uns demonstraram níveis de IL-12 mais baixos em pacientes com estas doenças do que em pacientes saudáveis (Gavett et al., 1995; Chung, 2001; Leonard & Sur, 2003), outros revelaram o contrário. Estes últimos demonstram valores séricos de IL-12 mais elevados em pacientes com DA relativamente aos pacientes saudáveis (Piancatelli et al., 2008; Zedan et al., 2015; Yang et al., 2017).

Magone et al. (2000) sugerem que a interleucina 12 é importante para o desenvolvimento da fase tardia da conjuntivite alérgica. Apesar desta interleucina potenciar a imunidade mediada por células, na presença de pequenas concentrações de IL-4, a IL-12 estimula a produção de células Th2. A ausência desta interleucina durante o desenvolvimento das células T efectoras previne a infiltração celular característica da fase tardia (Magone et al., 2000). Em 2006, Leonardi et al., identificaram uma maior concentração da IL-12 nas lágrimas de pacientes com conjuntivite alérgica sazonal comparativamente ao grupo controlo.

Assim, apesar das diferentes características de cada uma pode afirmar-se, tendo em conta os resultados obtidos, que estas três interleucinas têm um papel importante na CAC.

Em 2015, Côrte-Real et al. avaliou os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 em cães com CA e DA (n=10). Os resultados obtidos revelaram níveis de expressão superiores no grupo atópico embora estes valores sejam muito próximos dos obtidos para o grupo controlo (0.005 ± 0.0029 e 0.004 ± 0.0024 , respetivamente) e esta diferença não ser

estatisticamente significativa. Apesar desta interleucina ser do tipo Th2, e por isso, serem esperados níveis de expressão mais elevados no grupo atópico, a IL-10 é caracterizada pelos seus efeitos anti-inflamatórios. Esta característica parece explicar os resultados obtidos principalmente à luz dos resultados do presente estudo, em que há evidência de uma forte componente das citocinas pró-inflamatórias na CAC.

Considerando os resultados obtidos no grupo de cães atópicos, em que os níveis de expressão das citocinas IL-6 (291.48 ± 109.96 folds) e IL-12 (4.85 ± 1.09 folds) estão fortemente sobreexpressas em comparação com os valores anteriormente obtidos para a expressão de IL-10 (0.005 ± 0.0029), sugere-se que a resposta imunológica na CAC apresenta um padrão predominantemente inflamatório em comparação com uma componente anti-inflamatória.

3. Valor diagnóstico da expressão das interleucinas

De acordo com os resultados, existe uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de mRNA do gene de TNF- α e IL-12 e a média do score de CA em ambos os olhos dos animais atópicos. Para a IL-6 não foi possível demonstrar a existência de correlação entre as variáveis analisadas. Isto pode dever-se a erros na avaliação oftalmológica apesar da mesma ter sido feita de forma metódica e sistemática a cada um dos animais.

Em Medicina Humana, a avaliação quantitativa dos sinais clínicos constitui uma ferramenta útil no diagnóstico e avaliação da progressão da CA. Estão definidos critérios de classificação da CAh mediante a sua gravidade com base nos scores obtidos (Sánchez-Hernández et al., 2015; Takamura et al., 2017). Contudo, o mesmo não se verifica em Medicina Veterinária, em que os critérios de diagnóstico da CAC não estão ainda definidos.

Com base nos resultados apresentados pode afirmar-se que a expressão das interleucinas estudadas pode constituir uma ferramenta útil no diagnóstico e classificação da CAC, na medida em que a sua expressão se relaciona positivamente com a gravidade do quadro clínico. Esta afirmação é consistente com diferentes estudos em CAh nomeadamente com o estudo de Leonardi et al., 1998 em que verificaram uma correlação significativa entre os níveis de IL-6 e a gravidade da CA.

Para a DAC o sistema de classificação CADESI-04 permitiu a sua classificação para cada um dos animais atópicos verificando-se uma maior percentagem de animais com um quadro ligeiro (65%). No entanto, não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão dos genes das interleucinas e os valores de CADESI-04, permitindo assim inferir que os níveis de expressão das interleucinas na conjuntiva não se relacionam com a gravidade do quadro dermatológico. Em 2015, Lourenço-Martins et al. verificaram na amostra em estudo a inexistência de uma correlação entre a gravidade das lesões cutâneas dos animais com DA e os sinais clínicos de CAC, ou seja, entre o CADESI-

04 e o score de CAc. Pensa-se que haja uma predisposição individual para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória alérgica em determinadas áreas do corpo. Assim, pacientes sensibilizados para os mesmos alérgenos manifestam DA, CA, rinite ou uma associação destas doenças (Marsella, Nicklin & Lopez, 2006; Lourenço-Martins et al., 2015). Esta premissa corrobora os resultados obtidos no presente estudo. De facto, a existência de DAc com um quadro dermatológico ligeiro, moderado ou grave, não implica a presença de CA. A primeira existe sem a segunda e o mesmo se aplica na ordem inversa (Maggs, 2013a).

4. Limitações do estudo

No desenvolvimento do estudo encontraram-se naturalmente algumas dificuldades.

A escassez de literatura relativa à fisiopatologia da CAc dificulta a análise dos resultados obtidos, não permitindo fazer uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo com estudos semelhantes.

Outra limitação está relacionada com a constituição da amostra do grupo atópico, uma vez que existe uma grande variabilidade da mesma no que diz respeito às raças, espelhando a existência de fenótipos clínicos na DAc.

5. Perspetivas futuras

Outros estudos prospetivos seriam benéficos como complemento aos resultados do presente projeto. Assim, para uma caracterização imunológica cada vez mais completa da CAc, seria interessante avaliar a expressão génica de outras interleucinas.

Para colmatar os resultados inconclusivos seria importante a realização de estudos semelhantes a este, mas com uma amostragem superior. De forma a validar os resultados obtidos no presente estudo deve ser realizada posteriormente a quantificação da proteína da IL-6, TNF- α e IL-12, confirmando assim se a transcrição que é observada pela quantificação do mRNA corresponde a uma tradução para as proteínas equivalentes, as interleucinas propriamente ditas. O próximo passo poderia incluir o desenvolvimento da imunoterapia com os diferentes alvos e avaliação dos seus efeitos terapêuticos *in vitro* e *in vivo*.

Apostar em estudos que incidam sobre a fisiopatologia da CAc permite um avanço não só na Medicina Veterinária como pode significar também novos desenvolvimentos no conhecimento da CAh.

CAPÍTULO VI – Conclusões

Compreender a fisiopatologia da alergia ocular é crucial tanto para um tratamento bem-sucedido como para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

As citocinas definem o papel mais importante no desenvolvimento, diferenciação e função das células (linfócitos, eosinófilos, mastócitos, e células dendríticas) que fazem parte da resposta imunitária. Estas participam ativamente na resposta alérgica embora não se saiba exatamente o papel de cada uma delas neste complexo enredo.

Para além disso, estas têm a capacidade de exercer diferentes funções em diferentes células, o que dificulta a sua caracterização (Majewska et al., 2016). No que diz respeito à conjuntivite alérgica, são vários os estudos que a consideram como uma resposta inflamatória da superfície ocular caracterizada principalmente por citocinas Th2. Embora se assuma que as citocinas Th1 e Th2 sejam mutuamente inibidoras, há uma crescente evidência de que são as interações complexas entre si que modulam a resposta imunitária na CA (Enríquez-de-Salamanca et al., 2012).

Os resultados do presente estudo parecem enaltecer precisamente este facto. Com base neste, pode concluir-se que a CAc se caracteriza por uma resposta inflamatória mediada por duas das citocinas mais importantes neste processo (IL-6 e TNF- α), mas também pela ativação de uma resposta imunitária mediada por células (Th1) devido à IL-12.

Estes resultados permitem comprovar que a resposta imunitária inata e a adquirida se encontram intimamente relacionados entre si, e que esta ligação complexa define a resposta imunitária em doenças com a CAc.

Tendo em conta a sobreexpressão destas interleucinas nos cães com CA, deve ser investigada a possibilidade de serem utilizadas como alvos para a imunoterapia na CAc. De facto, parece ser importante o desenvolvimento de novas terapêuticas em Medicina Veterinária principalmente se se tiver em consideração aqueles animais que manifestam sobretudo o quadro oftalmológico em relação ao quadro dermatológico.

Ressalta-se ainda a importância de serem definidos critérios que permitam ao Médico Veterinário realizar um diagnóstico fácil e correto da CAc. Estes critérios potenciarão um maior número de casos diagnosticados e uma melhor abordagem terapêutica dos mesmos.

BIBLIOGRAFIA

Abelson, M.B., Butrus, S.I., Weston, J.H. & Rosner, B. (1984). Tolerance and absence of rebound vasodilation following topical ocular decongestant usage. *Ophthalmology*, 91(11), 1364-1367.

Abelson, M.B., Chambers, W.A. & Smith, L.M. (1990). Conjunctival allergen challenge. A clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Archives of Ophthalmology*, 108(1), 84-88.

Abelson, M.B., McLaughlin, J.T. & Gomes, P. (2011). Antihistamines in Ocular Allergy: Are They All Created Equal? *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(3), 205-211.

Abelson, M.B., Paradis, A., George, M.A., Smith, L.M., Maguire, L. & Burns, R. (1990). Effects of Vasocon-A in the Allergen Challenge Model of Acute Allergic Conjunctivitis. *Archives of Ophthalmology*, 108(4), 520-524.

Abelson, M.B., Schaefer, K. (1993). Conjunctivitis of allergic origin: immunologic mechanisms and current approaches to therapy. *Survey of Ophthalmology*, 38, 115-132.

Abelson, M.B., Shetty, S., Korchak, M., Butrus, S.I. & Smith, L.M. (2015). Advances in pharmacotherapy for allergic conjunctivitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(8), 1219-1231.

Abelson, M.B., Smith, L. & Chapin, M. (2003). Ocular allergic disease: Mechanisms, disease sub-types, treatment. *The Ocular Surface*, 1, 127-149.

Aggarwal, B.B., Samanta, A. & Feldmann, M. (2000). $\text{TNF}\alpha$. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J.J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 413-434). Waltham: Academic Press.

Akkoc, T., Akdis, M. & Akdis, C.A. (2011). Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 3(1), 11-20.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). The Adaptive Immune System. In: B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. (4th ed.). New York: Garland Science. Acedido em outubro 16, 2018, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>

Almaliotis, D., Michailopoulos, P., Gioulekas, D., Giouleka, P., Papakosta, D., Siempis, T. & Karampatakis, V. (2013). Allergic conjunctivitis and the most common allergens in Northern Greece. *World Allergy Organization Journal*, 6(1), 1-5.

Arman, M.J., Tretter, T., Eisenbeis, I., Bug, G., Decker, T., Aulitzky, W.E., Tilg, H., Huber, C. & Peschel, C. (1996). Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood*, 87(11), 4731-4736.

Artis, D., Humphreys, N.E., Bancroft, A.J., Rathwell, N.J., Potten, C.S. & Grencis, R.K. (1999). Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 190 (7), 953-962.

Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A. & Trinchieri, G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *The Journal of Immunology*, 160 (12), 5936-5944.

Baiula, M., Bedini, A., Baldi, J., Cavet, M.E., Govoni, P. & Spampinato, S. (2014). Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, causes apoptosis of eosinophils infiltrating the

- conjunctiva in late-phase experimental ocular allergy. *Drug design, development and therapy*, 8, 745-757.
- Baiula, M., Spartà, A., Bedini, A., Carbonari, G., Bucolo, C., Ward, K.W., Zhang, J.Z., Govoni, P. & Spampinato, S. (2011). Eosinophil as a cellular target of the ocular anti-allergic action of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist. *Molecular Vision*, 17, 3208-3223.
- Barnes, K.C. (2010). An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 16-e11.
- Bauchau, V. & Durham, S.R. (2004). Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *The European Respiratory Journal*, 24(5), 758-764.
- Bensignor, E., Marignac, G., Crosaz, O. & Cavana, P. (2013). Pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(2), 292.
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*, 321(7258), 424.
- Bielory, L. (2000). Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), 805-816.
- Bielory, L. (2006). Allergic diseases of the eye. *The Medical clinics of North America*, 90(1), 129-148.
- Bielory, L. (2008). Ocular allergy treatment. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28(1), 189-224.
- Bielory, L. (2010). Allergic conjunctivitis and the impact of allergic rhinitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10(2), 122-134.
- Bielory, L. (2011). Ocular Allergy. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(5), 740-758.
- Bielory, L. (2012). Allergic conjunctivitis: the evolution of therapeutic options. *Allergy and Asma Proceedings*, 32(2), 129-139.
- Bielory, L. & Friedlaender, M.H. (2008). Allergic Conjunctivitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28, 43-58.
- Bielory, L. & Ghafoor, S. (2005). Histamine receptors and the conjunctiva. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5(5), 437-440.
- Bielory, B.P., Perez, V.L. & Bielory, L. (2010). Treatment of seasonal allergic conjunctivitis with ophthalmic corticosteroids: in search of the perfect ocular corticosteroids in the treatment of allergic conjunctivitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(5), 469-477.
- Bisca, M. (1997). Current Therapy of Allergic Conjunctivitis. *Current Therapeutic Research*, 58(11), 828-841.
- Bistner, S. (1994). Allergic- and immunologic-mediated diseases of the eye and adnexae. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 24(4), 711-734.
- Bizikova, P., Pucheu-Haston, C.M., Eisenschenk, M.N., Nuttall, T. & Santoro, D. (2015a). Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 96-e26.

- Bizikova, P., Santoro, D., Marsella, R., Nuttall, T., Eisenschenk, M.N., & Pucheu-Haston, C.M. (2015b). Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 79-e24.
- Blaiss, M.S. (2007). Allergic rhinoconjunctivitis: burden of disease. *Allergy and Asthma Proceedings*, 28(4), 393-397.
- Bonini, S. (2006). Allergic Conjunctivitis: The Forgotten Disease. *Chemical Immunology and Allergy*, 91, 110-120.
- Bonini, S., Bonini, S., Lambiase, A., Marchi, S., Pasqualetti, P., Zuccaro, O., Rama, P., Magrini, L., Juhas, T. & Bucci, M.G. (2000). Vernal keratoconjunctivitis revisited: a case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology*, 107(6), 1157-1163.
- Bonini, S., Bonini, A., Vecchione, A., Naim, D.M., Allansmith, M.R. & Balsano, F. (1988). Inflammatory changes in conjunctival scrapings after allergen provocation in humans. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82, 462-469.
- Bonini, S., Gramiccioni, C., Bonini, M. & Bresciani, M. (2007). Practical approach to diagnosis and treatment of ocular allergy: a 1-year systematic review. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7(5), 446-449.
- Broide, D.H. (2009). Immunomodulation of allergic disease. *Annual Review of Medicine*, 60, 279-291.
- Brynskov, J., Nielsen, O.H., Ahnfelt-Rønne, I. & Bendtzen, K. (1994). Cytokines (immunoinflammatory hormones) and their natural regulation in inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis): a review. *Digestive diseases*, 12(5), 290-304.
- BuBmann, C., Bieber, T. & Novak, N. (2009). Systemic therapeutic options for severe atopic dermatitis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7(3), 205-219.
- Bundoc, V.G. & Keane-Myers, A. (2007). IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Experimental Eye Research*, 85(4), 575-579.
- Bunikowski, R., Gerhold, K., Brautigam, M., Hamelmann, E., Renz, H. & Wahn, U. (2001). Effect of low-dose cyclosporin a microemulsion on disease severity, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in severe pediatric atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 125(4), 344-348.
- Butrus, S. & Portela, R. (2005). Ocular allergy: diagnosis and treatment. *Ophthalmology clinics of North America*, 18(4), 485-492.
- Cavaillon, J.M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 48(10), 445-453.
- Chigbu, D.I. (2009). The management of allergic eye diseases in primary eye care. *Contact lens & anterior eye*, 32(6), 260-272.
- Chomarat, P., Risoan, M.C., Banchereau, J. & Miossec, P. (1993). Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(2), 523-527.
- Chowdhury, B. (2013). Allergic conjunctivitis – A review. *Dehli Ophthalmological Society Times*, 19, 41-47.

- Chung, F. (2001). Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . *Mediators of Inflammation*, 10(2), 51-59.
- Clark, R. & Kupper, T. (2005). Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 125 (4), 629-637.
- Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J. & Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role of interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *The Journal of Experimental Medicine*, 186 (10), 1737-1747.
- Comabella, M., Balashov, K., Issazadeh, S., Smith, D., Weiner, H.L. & Khoury, S.J. (1998). Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(4), 671-678.
- Comstock, T.L. & Decory, H.H. (2012). Advances in corticosteroid therapy for ocular inflammation: loteprednol etabonate. *International Journal of Inflammation*, 2012 (789623), 1-11.
- Cook, E.B., Stahl, J.L., Barney, N.P. & Graziano, F.M. (2002). Mechanisms of antihistamines and mast cell stabilizers in ocular allergic inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation & Allergy*, 1(2), 167-180.
- Cook, E.B., Stahl, J.L., Miller, S.T., Gern, J.E., Sukow, K.A., Graziano, F.M. & Barney, N.P. (1998). Isolation of human conjunctival mast cells and epithelial cells: tumor necrosis factor- α from mast cells affects intercellular adhesion molecule 1 expression on epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39 (2), 336-343.
- Côrte-Real, M.S.A. (2015). *Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Côrte-Real, M., Lourenço, A.M., Nunes, T., Cartaxeiro, C., Tavares, L., Gil, S. & Delgado, S. (2015). IL-10 Gene Expression in Canine Allergic Conjunctivitis. [abstract]. In *ESVO Meeting Lisbon 2015: Book of Proceedings, October 1-4*, p.100.
- Cousens, L.P., Orange, J.S., Su, H.C. & Biron, C.A. (1997). Interferon- α /beta inhibition of interleukin 12 and interferon- γ production in vitro and endogenously during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (2), 634-639.
- D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C. & Trinchieri, G. (1995). Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor α production. *The Journal of Experimental Medicine*, 181 (2), 537-546.
- Day, M.J. (2008). Basic Immunology. In M.J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*. (pp. 11-60). Langford: Manson Publishing.
- Day, M.J. & Crispin, S. (2008). Immune-mediated ocular disease. In M.J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*. (pp. 263-286). Langford: Manson Publishing.
- Day, M.J. & Schultz, R.D. (2014). An overview of the immune system: innate and adaptive immunity and the inflammatory response. In: M.J. Day & R.D. Schultz (Eds.). *Veterinary Immunology – Principles and Practice*. (pp. 1-14). London: CRC Press.

De Bruin Weller, M.S., Rockmann, H., Knulst, A.C. & Bruijnzeel-Koomen, C.A. (2013). Evaluation of the adult patient with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 43(3), 279-291.

De Vos, A.F., Hoekzema, R. & Kijlstra, A. (1992). Cytokines and uveitis, a review. *Current Eye Research*, 11(6), 581-597.

De Waal Malefyt, R., Figdor, C.G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., Dang, W., Zurawski, G. & de Vries, J.E. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *Journal of Immunology*, 151(11), 6370-6381.

DeBoer, D.J. (2017). The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 25-e6.

DeBoer, D.J. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81 (3-4), 271-276.

Durham, S.R. (1998). The inflammatory nature of allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 28(6), 20-24.

Durham, S.R., Walker, S.M., Varga, E.M., Jacobson, M.R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S.J., Hamid, Q.A. & Nouri-Aria, K.T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 341(7), 468-475.

Echtenacher, B., Falk, W., Männel, D.N. & Krammer, P.H. (1990). Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *The Journal of Immunology*, 145(11), 3762-3766.

el-Shabrawi, Y., Livir-Rallatos, C., Christen, W., Baltatzis, S. & Foster, C.S. (1998). High levels of interleukin-12 in the aqueous humor and vitreous of patients with uveitis. *Ophthalmology*, 105(9), 1659-1663.

Enríquez-de-Salamanca, A., Bonini, S. & Calonge, M. (2012). Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(5), 523-533.

Erdinest, N. & Solomon, A. (2014). Topical immunomodulators in the management of allergic eye disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(5), 457-463.

Esson, D.W. (2015). Allergic Conjunctivitis. In: D.W. Esson (Ed.), *Clinical Atlas of Canine and Feline Ophthalmic Disease*. (pp 78-79). West Sussex: Wiley Blackwell.

Esche, C., Shurin, M. R., & Lotze, M. T. (2000). IL-12. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J.J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 187-201). Waltham: Academic Press

Fauquert, J., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Rondon, C., Calder, V., Silva, D., Kvenshagen, B.K., Caillebaut, I., Allergri, P., Santos, N., Doan, S., Formigo, D.P., Chiambaretta, F., Delgado, L & Leonardi, A. (2017). Conjunctival Allergen Provocation Test: guidelines for daily practice. *Allergy*, 72(1), 43-54.

Favrot, C. (2009). Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis. *European Journal of Companion Animal Practice*, 19(3), 219-222.

- Favrot, C. (2014). Clinical signs of canine atopic dermatitis. In: C. Noli, A. Foster & W. Rosenkrantz (Eds.), *Veterinary Allergy*. (pp. 65-69). West Sussex: Wiley Blackwell.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 23-31.
- Featherstone, H.J. & Heinrich, C.L. (2014). Eye Examination and Diagnostics. In: K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*. (3rd ed.). (pp. 103-144). West Sussex: Wiley Blackwell.
- Featherstone, H. & Scurrall, E. (2015). Ocular sampling in the dog and cat. *In Practice*, 37, 510-539.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., Elliott, M.J., Williams, R.O. & Maini, R.N. (1995). TNF alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766, 272-278.
- Friedlaender, M.H. (2011). Ocular allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11, pp. 477-482.
- Fukagawa, K., Saito, H., Tsubota, K., Shimmura, S., Tachimoto, H., Akasawa, A. & Oguchi, Y. (1997). RANTES production in a conjunctival epithelial cell line. *Cornea*, 16(5), 564-570.
- Fukui, H. (2008). Progress in allergy signal research on mast cells: up-regulation of histamine signal-related gene expression in allergy model rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106(3), 325-331.
- Galatowicz, G., Ajayi, Y., Stern, M.E. & Calder, V.L. (2007). Ocular antiallergic compounds selectively inhibit human mast cell cytokines in vitro and conjunctival cell infiltration in vivo. *Clinical and Experimental Allergy*, 37(11), 1648–1656.
- Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445-454.
- Gamache, D.A., Dimitrijevic, S.D., Weimer, L.K., Lang, L.S., Spellman, J.M., Graff, G. & Yanni, J.M. (1997). Secretion of proinflammatory cytokines by human conjunctival epithelial cells. *Ocular Immunology and Inflammation*, 5(2), 117-128.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(20), 7251–7255.
- Gavett, S.H., O'Hearn, D.J., Li, X., Huang, S.K., Finkelman, F.D. & Wills-Karp, M. (1995). Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1527-1536.
- Gelatt, K.N. & MacKay, E.O. (1998). Distribution of intraocular pressure in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 1(2-3), 109-114.
- Gharagozlou, M., Farhadi, E., Khaledi, M., Behniafard, N., Sotoudeh, S., Salari, R., Darabi, B., Fathi, S.M., Mahmoudi, M., Aghamohammadi, A., Amirzargar, A.A. & Rezaei, N. (2013). Association between the interleukin 6 genotype at position -174 and atopic dermatitis. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 23(2), 89-93.

- Ghasemi, H. (2018). Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocular Immunology & Inflammation*, 26(1), 37-50.
- Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., Owlia, P., Hassan, Z.M. & Faghihzadesh, S. (2012). Roles of IL-10 in ocular inflammations: a review. *Ocular Immunology & Inflammation*, 20(6), 406-418.
- Giuliano, E.A. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 34(3), 707-723.
- Gomes, P.J. (2014). Trends in prevalence and treatment of ocular allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(5), 451-456.
- Gradman, J. & Wolthers, O.D. (2006). Allergic conjunctivitis in children with asthma, rhinitis and eczema in a secondary outpatient clinic. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17(7), 524-526.
- Griffin, C.E. (2014). Diagnosis of canine atopic dermatitis. In: C. Noli, A. Foster & W. Rosenkrantz (Eds.), *Veterinary Allergy*. (pp. 70-77). West Sussex: Wiley Blackwell.
- Griffin, C.E., & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): Clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 255-269.
- Griffin, C.E. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 363-383.
- Groneberg, D.A., Bielory, L., Fischer, A., Bonini, S. & Wahn, U. (2003). Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. *Allergy*, 58(11), 1101-1113.
- Guaguère, E., Steffan, J. & Olivry, T. (2004). Cyclosporin A: a new drug in the field of canine dermatology. *Veterinary Dermatology*, 15(2), 61-74.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114 (3-4), 207-208.
- Hamza, T., Barnett, J.B. & Bingyun, L. (2010). Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 789-806.
- Hartley, C. (2014). The Conjunctiva and third eyelid. In D. Gould & G. McLellan (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology*. (3rd ed.). (pp. 182-199). Gloucester: BSAVA.
- Heinrich, C. (2014). The ocular examination. In D. Gould & G. McLellan (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology*. (3rd ed.). (pp. 1-23). Gloucester: BSAVA.
- Heinrich, P.C., Castell, J.V. & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3), 621-636.
- Hendrix, D.V.H. (2013). Diseases and Surgery of the Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: K.N. Gelatt, B.C. Gilger & T.J. Kern (Eds.), *Veterinary Ophthalmology*. (5th ed.). (pp. 945-975). West Sussex: Wiley Blackwell.
- Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P. & Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, 11, 196.

- Hill, P.B., Lo, A., Eden, C.A., Huntley, S., Morey, V., Ramsey, S., Richardson, C., Smith, D.J., Sutton, C., Taylor, M.D., Thorpe, E., Tidmarsh, R. & Williams, V. (2006). Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Veterinary Record*, 158(16), 533-539.
- Hillier, A. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 289-304.
- Hillier, A. & Griffin, C.E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 147-151.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H. & Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 82(16), 5490-5494.
- Hori, Y., Muraguchi, A., Suematsu, S., Matsuda, T., Yoshizaki, K., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1988). Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. *The Journal of Immunology*, 141 (5), 1529-1535.
- Hubbard, T.L. & White, P.D. (2011). Comparison of subjective and objective intradermal allergy test scoring methods in dogs with atopic dermatitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(6), 399-405.
- Irkec, M.T. & Bozkurt, B. (2012). Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(5), 534-539.
- Ishida, W., Fukuda, K., Kajisako, M., Takahashi, A., Sumi, T., van Rooijen, N. & Fukushima, A. (2010). Conjunctival macrophages act as antigen-presenting cells in the conjunctiva during the development of experimental allergic conjunctivitis. *Molecular vision*, 16, 1280-1285.
- Jaeger, K., Linek, M., Power, H.T., Bettenay, S.V., Zabel, S., Rosychuk, R.A., Mueller, R.S. (2010). Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 118-122.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchok, M.J. (2001). Principles of innate and adaptive immunity. In: C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport & M.J. Shlomchok (Eds.). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). New York: Garland Science. Acedido em outubro 16, 2018, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
- Jia, X., Hu, M., Wang, C. Zhang, F., Han, Q., Zhao, R., Huang, Q., Xu, H., Yuan, H., Ren, H. (2011). Coordinated gene expression of Th17- and Treg-associated molecules correlated with resolution of the monophasic experimental autoimmune uveitis. *Molecular Vision*, 17, 1493-1507.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A. & Lotz, M. (1989). Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 142, 144-147.
- Kari, O. & Saari, K.M. (2010). Updates in the treatment of ocular allergies. *Journal of Asthma and Allergy*, 3, 149-158.
- Keppel, K.E., Campbell, K.L., Zuckermann, F.A., Greeley, E.A., Schaeffer, D.J. & Husmann, R.J. (2008). Quantification of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(3-4), 337-344.

Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. & Imanaka, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics*, 40(9), 1249-1255.

Kirnbauer, R., Köck, A., Schwarz, T., Urbanski, A., Krutmann, J., Borth, W., Damm, D., Shipley, G., Ansel, J.C. & Luger, T.A. (1989). IFN-beta 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *The Journal of Immunology*, 142 (6), 1922-1928.

Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *The Journal of the American Society of Hematology*, 74 (1), 1-10.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. & Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of Experimental Medicine*, 184 (4), 741-746.

Kumagai, N., Fukuda, K., Ishimura, Y. & Nishida, T. (2000). Synergistic induction of eotaxin expression in human keratocytes by TNF-alpha and IL-4 or IL-13. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(6), 1448-1453.

La Rosa, M., Lionetti, E., Reibaldi, M., Russo, A., Longo, A., Leonardi, S., Tomarchio, S., Avitabile, T. & Reibaldi, A. (2013). Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(18), 1-8.

Leonard, P. & Sur, S. (2003). Interleukin-12: potential role in asthma therapy. *Biodrugs*, 17(1), 1-7.

Leonardi, A. (1999). Pathophysiology of allergic conjunctivitis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 228, 21-23.

Leonardi, A. (2002). The central role of conjunctival mast cells in the pathogenesis of ocular allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2(4), 325-331.

Leonardi, A. (2013a). Management of vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology and Therapy*, 2, 73-88.

Leonardi, A. (2013b). Allergy and allergic mediators in tears. *Experimental Eye Research*, 117, 106-117.

Leonardi, A., Bogacka, E., Fauquert, J.L., Groblewska, A., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Doan, S., Marmouz, F., Demoly, P. & Delgado, L. (2012). Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy*, 67(11), 1327-1337.

Leonardi, A., Borghesan, F., DePaoli, M., Plebani, M. & Secchi, A.G. (1998). Procollagens and inflammatory cytokine concentrations in tarsal and limbal vernal keratoconjunctivitis. *Experimental Eye Research*, 67(1), 105-112.

Leonardi, A., Brun, P., Tavolato, M., Plebani, M., Abatangelo, G. & Secchi, A.G. (2003a). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *European Journal of Ophthalmology*, 13(7), 606-610.

Leonardi, A., Castegnaro, A., Valerio, A.L., Lazzarini, D. (2015). Epidemiology of allergic conjunctivitis: clinical appearance and treatment patterns in a population-based study. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(5), 482-488.

- Leonardi, A., Curnow, S.J., Zhan, H. & Calder, V.L. (2006). Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical and Experimental Allergy*, 36 (6), 777-784.
- Leonardi, A., Doan, S., Fauquert, J.L., Bozkrt, B., Allegri, P., Marmouz, F., Rondon, C., Jedrzejczak, M., Hellings, P., Delgado, L., Calder, V. (2017). Diagnostic tools in ocular allergy. *Allergy*, 72(10), 1485-1498.
- Leonardi, A., Jose, P.J., Zhan, H. & Calder, V.L. (2003b). Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*, 110(3), 487-492.
- Leonardi, S., Marchese, G., Marseglia, G.L. & La Rosa, M. (2007). Montelukast in allergic diseases beyond asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*, 28(3), 287-291.
- Leonardi, A., Motterle, L. & Bortolotti, M. (2008). Allergy and the eye. *Clinical and Experimental Allergy*, 153(1), 17-21.
- Leonardi, A., Piliego, F., Castegnaro, A., Lazzarini, D., Valerio, A.L., Mattana, P., Fregona, I. (2015). Allergic conjunctivitis: a cross-sectional study. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(6), 1118-1125.
- Leonardi, A. & Quintieri, L. (2010). Olopatadine: a drug for allergic conjunctivitis targeting the mast cell. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(6), 969-981.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, 25(4), 402-408.
- Lourenço-Martins, A.M., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M.C., Morais-Almeida, M. & Correia, J.H. (2011). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 14(4), 248-256.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D. & Xia, B. (2012). CD4⁺ T cells: differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012(925135), 1-12.
- Maggs, D.J. (2013a). Conjunctiva. In: D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. (5th ed.). (pp. 140-158). Missouri: Elsevier Saunders.
- Maggs, D.J. (2013b). Ocular Pharmacology and Therapeutics. In: D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. (5th ed.). (pp. 27-59). Missouri: Elsevier Saunders.
- Magone, M.T., Whitcuo, S.M., Fukushima, A., Chan, C.C., Silver, P.B. & Rizzo, L.V. (2000). The role of IL-12 in the induction of late-phase cellular infiltration in a murine model of allergic conjunctivitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(2), 299-308.
- Majewska, A., Gajewska, M., Dembele, K., Maciejewski, H., Prostek, A. & Jank, M. (2016). Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1-14.
- Mantelli, F., Calder, V.L. & Bonini, S. (2013). The anti-inflammatory effects of therapies for ocular allergy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(9), 786-793.
- Marsella, R. (2013). Hypersensitivity Disorders. In W.H. Miller, C.E. Griffin & K.L. Campbell (Eds.), *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. (7th ed.). (pp. 363-431). Missouri: Elsevier Saunders.

Marsella, R., Nicklin, C. & Lopez, J. (2006). Studies on the role of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology*, 17(5), 306-312.

Marsella, R. & Olivry, T. (2001). The ACVD Task Force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 331-345.

Marsella, R., Sousa, C.A., Gonzales, A.J. & Fadok, V.A. (2012). Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(2), 194-207.

Martin, C.L. (2010). Conjunctiva and Third Eyelid. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*. (pp. 183-218). London: Manson Publishing.

Mashige, K.P. (2017). Ocular allergy. *Health SA Gesondheid*, 22, 112-122.

Matsuda, S. & Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 119-125.

May, L. T., Helfgott, D. C., & Sehgal, P. B. (1986). Anti- β -interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: Structural studies of the β 2 interferon involved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 83(23), 8957-8961.

Maziak, W., Behrens, T., Brasky, T.M., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, S.K. & Keil, U. (2003). Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy*, 58(7), 572-579.

Mescher, A.L. (2016). The Eye & Ear: Special Sense Organs (pp. 490-523). In A.L. Mescher (Ed.), *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. (14th ed.). (pp.490-523). New York: McGraw-Hill Education.

Ming, W.J., Bersani, L. & Mantovani, A. (1987). Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology*, 138(5), 1469-1474.

Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P. & Caput, D. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362(6417), 248-250.

Mishra, G.P., Tamboli, V., Jwala, J. & Mitra, A.K. (2011). Recent patents and emerging therapeutics in the treatment of allergic conjunctivitis. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 5(1), 26-36.

Mo, J.H., Kang, E.K., Quan, S.H., Rhee, C.S., Lee, C.H. & Kim, D.Y. (2011). Anti-tumor necrosis factor- α treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy*, 66 (2), 279-286.

Morgan, S.J., Williams, J.H., Walls, A.F., Church, M.K., Holgate, S.T. & McGill, J.L. (1991). Mast cell numbers and staining characteristics in the normal and allergic human conjunctiva. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 87, 111-116.

Mortemousque, B., Jacquet, A., Richard, C., Depont, F., Colin, J. & Moore, N. (2004). Randomised double masked trial comparing the efficacy and tolerance of 0.05% mequitazine

eye drops versus 0.05% levocabastine and placebo in allergic conjunctivitis induced by a conjunctival provocation test with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *British Journal of Ophthalmology*, 88(3), 336-340.

Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145-173.

Ngoc, P.L., Gold, D.R., Tzianabos, A.O., Weiss, S.T. & Celedón, J.C. (2005). Cytokines, allergy, and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5(2), 161-166.

Nivenius, E., Montan, P.G., Chryssanthou, E., Jung, K., van Hage-Hamsten, M. & van der Ploeg, I. (2004). No apparent association between periocular and ocular microcolonization and the degree of inflammation in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(5), 725-730.

Novack, G.D., Howes, J., Crockett, R.S. & Sherwood, M.B. (1998). Change in intraocular pressure during long-term use of loteprednol etabonate. *Journal of Glaucoma*, 7(4), 266-269.

Nuttall, T.J., Knight, P.A., McAleese, S.M., Lamb, J.R. & Hill, P.B. (2002). Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(5), 789-795.

O'Brien, T.P. (2013). Allergic conjunctivitis: an update on diagnosis and management. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(5), 543-549.

Ofri, R. (2006). Clinical approach to the dog with red eyes. In *Proceedings of the World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA 2006*, Prague, 11-14 October, pp. 585-587.

Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T. & Prélaud, P. (2010). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(3), 233-248.

Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T. & Prélaud, P. (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11(210), 1-15.

Olivry, T., Saridomichelakis, M. & International Committee on Atopic Diseases of Animals (ICADA) (2013). Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(2), 225-e249.

Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C.E., Hill, P.B. & International Committee on Atopic Diseases of Animals (ICADA) (2014). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 25(2), 77-85.

Ono, S.J. & Abelson, M.B. (2005). Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 118-122.

Owen, C.G., Shah, A., Henshaw, K., Smeeth, L. & Sheikh, A. (2004). Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. *The British Journal of General Practice*, 54(503), 551-456.

Ozaki, A., Seki, Y., Fukushima, A. & Kubo, M. (2005). The control of allergic conjunctivitis by suppressor of cytokine signaling (SOCS)3 and SOCS5 in a murine model. *Journal of Immunology*, 175(8), 5489–5497.

Öztürk, P., Aral, M., Kurutaş, E. & Çelik, M. (2012). Serum Levels of IL-8, Tnf- α And IL-6 in Children with Atopic Dermatitis. *The Journal of Current Pediatrics*, 10(2), 50-54. Acedido em outubro 29, 2018, disponível em https://www.researchgate.net/publication/287742590_Serum_Levels_of_IL-8_Tnf-a_And_IL-6_in_Children_with_Atopic_Dermatitis

Patterson, R. (1960). Investigations of spontaneous hypersensitivity of the dog. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 31, 351-363.

Payvandi, F., Wu, L., Naziruddin, S.D., Haley, M., Parton, A., Schafer, P.H., Chen, R.S., Muller, G.W., Hughes, C.C. & Stirling, D.I. (2005). Immunomodulatory drugs (IMiDs) increase the production of IL-2 from stimulated T cells by increasing PKC-theta activation and enhancing the DNA-binding activity of AP-1 but not NF-kappaB, OCT-1, or NF-AT. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 25(10), 604–616.

Peña, M.A. & Leiva, M. (2008). Canine conjunctivitis and blepharitis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 38(2), 233-249.

Piancatelli, D., Bellotta, L., Del Beato, T., Duse, M. & Della Penna, M.R. (2008). Total IL-12 Levels are Increased in Paediatric Atopic Dermatitis: Correlations with Age and Disease Severity. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21(2), 359-365.

Pober, J.S., Gimbrone, M.A. Jr, Lampierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R. & Springer, T.A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *Journal of Immunology*, 137(6), 1893-1896.

Pope, R.M. & Shahrara, S. (2013). Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 9(4), 252-256.

Richter, K.R., Nasr, A.N. & Mexas, A.M. (2018). Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. *Veterinary Pathology*, 55(1), 53-67.

Rico, A.S.M.V. (2014). *Os Testes de Provocação Conjuntival na Avaliação da Eficácia da Imunoterapia Alergénio-específica Rush na Dermatite Atópica Canina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Rodrigues, E.B., Farah, M.E., Maia, M., Penha, F.M., Regatieri, C., Melo, G.B., Pinheiro, M.M. & Zanetti, C.R. (2009). Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Progress in Retinal & Eye Research*, 28(2), 117-144.

Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 85(1), 9-21.

Rosario, N. & Bielory, L. (2011). Epidemiology of allergic conjunctivitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11(5), 471-476.

Rustin, M.H. (2007). The safety of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis: a review. *The British Journal of Dermatology*, 157(5), 861–873.

Sánchez-Hernández, M.C., Montero J., Rondon, C., Benítez del Castillo, J.M., Velázquez, E., Herreras, J.M., Fernández-Parra, B., Merayo-Llôves, J., Del Cuvillo, A., Veja, F., Valero, A.,

- Panizo, C., Montoro, J., Matheu, V., Lluch-Bernal, M., González, M.L., González, R., Dordal, M.T., Dávila, I., Colás, C., Campo, P., Antón, E. & Navarro, A. (2015). Consensus Document on Allergic Conjunctivitis (DECA). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 25(2), 94-106.
- Sano, Y., Osawa, H., Sotozono, C. & Kinoshita, S. (1998). Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(10), 1953-1957.
- Santoro, D., Marsella, R., Pucheu-Haston, C.M., Eisenschenk, M.N.C., Nuttall, T. & Bizikova, P. (2015). Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: Skin barrier and host-microorganism interaction. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 84-e25.
- Scadding, G., Hellings, P., Alobid, I., Bachert, C., Fokkens, W., van Wijk, R.G., Gevaert, P., Guilemany, J., Kalogjera, L., Lund, V., Mullol, J., Passalacqua, G., Toskala, E. & van Drunen, C. (2011). Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clinical and Translational Allergy*, 1(2), 1-39.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(5), 878-888.
- Sehgal, V.N., Srivastava, G. & Dogra, S. (2008) Tacrolimus in dermatology-pharmacokinetics, mechanism of action, drug interactions, dosages, and side effects: part I. *Skinmed*, 7(1), 27–30.
- Shida, M., Kadoya, M., Park, S.J., Nishifuji, K., Momoi, Y. & Iwasaki, T. (2004). Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(1-2), 19-31.
- Sihra, B.S., Kon, O.M., Durham, S.R., Walker, S., Barnes, N.C. & Kay, A.B. (1997). Effect of cyclosporin A on the allergen-induced late asthmatic reaction. *Thorax*, 52(5), 447–452.
- Sengoku, T., Morita, K., Sakuma, S., Motoyama, Y. & Goto, T. (1999). Possible inhibitory mechanism of FK506 (tacrolimus hydrate) ointment for atopic dermatitis based on animal models. *European Journal of Pharmacology*, 379(2-3), 183–189.
- Singh, K., Axelrod, S. & Bielory, L. (2010). The epidemiology of ocular and nasal allergy in the United States, 1988-1994. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 778-783.
- Smeland, E.B., Blomhoff, H.K., Funderud, S., Shalaby, M.R. & Espevik, T. (1989). Interleukin 4 induces selective production of interleukin 6 from normal human B lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(4), 1463-1468.
- Snijders, A., Hilken, C.M., van der Pouw Kraan, T.C., Engel, M., Aarden, L.A. & Kapsenberg, M.L. (1996). Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *The Journal of Immunology*, 156 (6), 1207-1212.
- Sorkin, E.M. & Waard, A. (1986). Ocular sodium cromoglycate. An overview of its therapeutic efficacy in allergic eye disease. *Drugs*, 31, pp- 131-148.
- Spector, S.L. & Raizman, M.B. (1994). Conjunctivitis medicamentosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94(1), 134–136.
- Stahl, J.L. & Barney, N.P. (2004). Ocular allergic disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4(5), 455-459.

- Stahl, J.L., Cook, E.B., Graziano, F.M. & Barney, N.P. (1999). Human conjunctival mast cells: expression of Fc ϵ RI, c-kit, ICAM-1, and IgE. *Archives of Ophthalmology*, 117 (4), 493-497.
- Stanley, A.C. & Lacy, P. (2010). Pathways for cytokine secretion. *Physiology*, 25(4), 218-229.
- Stumpf, T.H., Case, R., Shimeld, C., Easty, D.L. & Hill, D.J. (2002). Primary herpes simplex virus type 1 infection of the eye triggers similar immune responses in the cornea and the skin of the eyelids. *Journal of General Virology*, 83(Pt 7), 1579-1590.
- Suberville, S., Bellocq, A., Peguillet, I., Lantz, O., Stordeur, P., Fouqueray, B. & Baud, L. (200). Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-10 synthesis by human monocytic cells. *European Cytokine Network*, 12(1), 141-146.
- Suchaoin, W., Pereira de Sousa, I., Netsomboon, K., Lam, H.T., Laffleur, F. & Bernkop-Schnürch, A. (2016). *International Journal of Pharmaceutics*, 510 (1), 255-262.
- Suzuki, S., Goto, E., Dogru, M., Asano-Kato, N., Matsumoto, Y., Hara, Y., Fujishima, H. & Tsubota, K. (2006). Tear film lipid layer alterations in allergic conjunctivitis. *Cornea*, 25(3), 277-280.
- Swamy, B.N., Chilov, M., McClellan, K. & Petsoglou, C. (2007). Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in allergic conjunctivitis: meta-analysis of randomized trial data. *Ophthalmic Epidemiology*, 14(5), 311-319.
- Takamura, E., Uchio, E., Ebihara, N., Ohno, S., Ohashi, Y., Okamoto, S., Kumagai, N., Satake, Y., Shoji, J., Nakagawa, Y., Namba, K., Fukagawa, K., Fukushima, A., Fujishima, H. & Japanese Society of Allergology (2017). Japanese guidelines for allergic conjunctival diseases 2017. *Allergy International*, 66(2), 220-229.
- Tanaka, T., Narazaki & M., Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6 (10), 1-16.
- te Velde, A.A., Huijbens, R.J., Heije, K., de Vries, J.E. & Figdor, C.G. (1990). Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 76(7), 1392-1397.
- Thomas, P.S. (2001). Tumour necrosis factor- α : The role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunology and Cell Biology*, 79, 132-140.
- Tizard, I.R. (Ed.) (2012). *Veterinary Immunology*. (9th ed.). (pp. 1-29; 74-101). Missouri: Elsevier.
- Toshitani, A., Ansel, J.C., Chan, S.C., Li, S.H. & Hanifin, J.M. (1993). Increased Interleukin 6 Production by T Cells Derived from Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3), 299–304.
- Trepicchio, W.L., Bozza, M., Pedneault, G. & Dorner, A. J. (1996). Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, 157 (8), 3627-3634.
- Vesaluoma, M., Rosenberg, M.E., Teppo, A., Grönhagen-Riska, C., Haahtela, T. & Tervo, T. (1999). Tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) in tears of atopic patients after conjunctival allergen challenge. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(4), 537-542.
- Wakamatsu, T.H., Dogru, M., Ayako, I., Takano, Y., Matsumoto, Y., Ibrahim, O.M., Okada, N., Satake, Y., Fukagawa, K., Shimazaki, J., Tsubota, K. & Fujishima, H. (2010). Evaluation of

- lipid oxidative stress status and inflammation in atopic ocular surface disease. *Molecular vision*, 16, 2465-2475.
- Wanidworanun, C. & Strober, W. (1993). Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *Journal of Immunology*, 151(12), 6853-6861.
- Wilhem, S., Kovalik, M. & Favrot, C. (2011). Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(2), 143–149.
- Williams, P.B. & Sheppard, J.D. Jr. (2005). Omalizumab: a future innovation for treatment of severe ocular allergy? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(12), 1603–1609.
- Winther, L., Malling, H.J., Moseholm, L. & Mosbech, H. (2000). Allergen-specific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. I. Efficacy estimated by a model reducing the bias of annual differences in pollen counts. *Allergy*, 55(9), 818–826.
- Wittich, F.W. (1941). Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal – seasonal hay fever (fall type) in a dog. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 12, 247-251.
- World Allergy Organization (2015). IgE in Clinical Allergy and Allergy Diagnosis. Acedido em dezembro 6, 2018, disponível em: <http://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/ige-in-clinical-allergy-and-allergy-diagnosis>
- Wu, W.C., Hu, D.N., Gao, H.X., Chen, M., Wang, D., Rosen, R & McCormick, S.A. (2010). Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced production of interleukin-6 by retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*, 16, 1864-1873.
- Yang, Y., Wang, Q., Song, X., Jiang, W., Tang, S., Shen, F. & Xie, S. (2017). Association between IL-4, IL-6, IL-18 polymorphisms and *atopic dermatitis* risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(5), 7375-7386.
- Yao, Y., Li, W., Kaplan, M.H. & Chang, C.H. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(12), 1899-1903.
- Yatim, K.M., & Lakkis, F.G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274-81.
- Yücel, O.E. & Ulus, N.D. (2016). Efficacy and safety of topical cyclosporine A 0.05% in vernal keratoconjunctivitis. *Singapore medical journal*, 57(9), 507-10.
- Zahir-Jouzani, F., Atyabi, A. & Mojtavavi, N. (2017). Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology*, 24(3), 123-131.
- Zedan, K., Rasheed, Z., Farouk, Y., Alzolibani, A.A., Saif, G.B., Ismail, H.A. & Al Robaee, A.A. (2015). Immunoglobulin E, interleukin-18 and interleukin-12 in patients with atopic dermatitis: correlation with disease activity. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(4), 1-5.
- Zhang, J.M. & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37.

**ANEXO I: Abstract da comunicação oral apresentada no Congresso da ESVO 2018:
“The Role of Pro-inflammatory and Th1 Cytokines in Allergic Conjunctivitis”**

Cláudia Varandas¹, Clara Cartaxeiro¹, Solange Gil¹, Esmeralda Delgado¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Purpose: To evaluate the mRNA expression of the pro-inflammatory (IL6 and TNF- α), and Th1 (IL-12) cytokines in canine allergic conjunctivitis.

Methods: Conjunctival samples were collected from 41 dogs: an experimental group with allergic conjunctivitis and atopic dermatitis (n=20) and healthy dogs that served as a control group (n=21). Complete dermatological and ophthalmic examinations were performed. Thus, atopic dogs were evaluated for ocular signs of allergic conjunctivitis (conjunctival hyperemia, chemosis, epiphora, ocular discharge, pruritus and concurrent keratitis), graded 0 to 3 according to severity. For assessing skin lesions a simplified scale, cAD Extent and Severity Index (CADESI)-4, was applied. mRNA was extracted from conjunctival samples and subsequently used to quantify cytokines expression using a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Results were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. For analysis purposes, the *Welch Two Sample t-test* was used to compare the relative levels of mRNA expression between the two groups.

Results: The mRNA levels of IL-6 and IL-12 were significantly higher in atopic group than in controls (p=1.31e-09 and p=0.0003, respectively). The average expression of TNF- α also seems to be higher in atopic group, however statistically there was no significant differences between atopic and healthy groups (p=0.18).

Conclusions: Overall our results suggest an increase of pro-inflammatory cytokines which are strongly involved on the innate immune response, and a Th1 subset activation. These results pinpoint to new therapeutic approaches involving immunotherapy in patients with allergic conjunctivitis.

Support: This work was supported by CIISA - Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (FMV/UL) (Project UID/CVT/276/2013), and by “Study of the immune response in canine allergic conjunctivitis.” (CIISA MIMV 5).

**ANEXO II: Abstract do Poster Científico apresentado no Congresso do CIISA 2018:
“Expression of Pro-inflammatory and Th1 Cytokines in Canine Allergic Conjunctivitis”**

Cláudia Varandas¹, Clara Cartaxeiro¹, Esmeralda Delgado¹, Solange Gil¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Background: Canine allergic conjunctivitis (cAC) is often included in the symptoms of canine atopic dermatitis (cAD). Although an allergic reaction is the most common cause of conjunctivitis in dogs, cAC is still poorly understood. Thus, the aim of the present study was to determine the gene expression of the pro-inflammatory (IL-6 and TNF- α) and Th1 (IL-12) cytokines in cAC.

Methods: Twenty cAD patients were evaluated for ocular signs of allergic conjunctivitis (conjunctival hyperemia, chemosis, epiphora, ocular discharge, pruritus and concurrent keratitis), graded 0 to 3 according to severity, and cAD Extent and Severity Index (CADESI)-4. Furthermore, conjunctival samples were collected from atopic dogs and 21 control dogs. mRNA was isolated from these samples and a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify cytokines expression.

Results: Cytokines expression was higher in the atopic group, IL-6 and IL-12 mRNA expression were respectively 291.5 ($p=1.31e-09$) and 4.9 ($p=0.0003$) times more present in atopic dogs when compared with the control samples. The average expression of TNF- α also seemed to be higher in atopic group, however statistically there were no significant differences between atopic and healthy groups ($p=0.18$). The mRNA levels of all cytokines in the atopic group exhibited a positive correlation ($Rho_{IL-6}=-0.28$; $Rho_{TNF-\alpha}=-0.57$; $Rho_{IL-12}=-0.50$) with allergic conjunctivitis clinical score, yet for IL-6 this correlation wasn't statistically relevant ($p_{IL-6}=0.24$; $p_{TNF-\alpha}=0.02$; $p_{IL-12}=0.049$). Statistically there was no significant correlation between cytokines gene expression levels in the atopic group with (CADESI)-4 values ($p>0.5$).

Conclusions: Results obtained indicate that IL-6 and TNF- α contribute to the development of the allergic response, as well as the IL-12, which is a critical factor in Th₁ differentiation. Thus, our results suggest an increase of pro-inflammatory cytokines which are strongly involved on the innate immune response, and a Th₁ subset activation. This raises the possibility of new therapeutic modalities involving immunotherapy to help in the clinical control of allergic conjunctivitis.

Keywords: allergic conjunctivitis, canine atopic dermatitis, interleukin 6, TNF- α , interleukin 12

Funding Acknowledgements: This work was supported by CIISA - Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (FMV/UL) (Project UID/CVT/276/2013), and by “Study of the immune response in canine allergic conjunctivitis.” (CIISA MIMV 5).

ANEXO III: Declaração de consentimento informado

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, portador(a) do cartão de cidadão n° _____, tutor(a) do animal de nome _____, raça _____, idade _____ e género _____, declaro que autorizo a colheita de uma amostra de conjuntiva de 2x2 mm após aplicação de anestesia tópica para realização de ensaio experimental acerca da “Contribuição para a Caracterização Clínica e Imunológica da Conjuntivite Alérgica Canina”, que tem como responsável a Professora Doutora Esmeralda Delgado.

Lisboa, ____ de _____ de 201__

ANEXO IV: Tabela de classificação CADESI-04 (adaptado de Olivry et al., 2014)

CADESI-04 (ICADA)			Eritema	Liquenificação	Escoriações e/ou Alopecia	TOTAL
Face	Região Periocular	1				
	Região Perilabial	2				
Pavilhão auricular (Face côncava)	Esquerdo	3				
	Direito	4				
Axila	Esquerda	5				
	Direita	6				
Extremidades Podais Anteriores	Esquerda	7				
	Direita	8				
Extremidades Podais Posteriores	Esquerda	9				
	Direita	10				
Região Flexora do Cotovelo	Esquerda	11				
	Direita	12				
Metacarpo (Face palmar)	Esquerdo	13				
	Direito	14				
Flanco	Esquerdo	15				
	Direito	16				
Virilha	Esquerda	17				
	Direita	18				
Abdômen		19				
Períneo		20				
Cauda (ventro-proximal)		21				
Classificar cada região e cada lesão com grau: <div> 0 - ausente 1 - ligeiro 2 - moderado 3 - grave </div>			Score TOTAL (21 x 3 x 3= 189)			

ANEXO V: Ficha de “Colheita de Biópsia de Conjuntiva” (Côrte-Real, 2015).



Tese MIMV “Contribuição para a Caracterização Clínica e Imunológica da Conjuntivite Alérgica Canina.”

Colheita nº ____

Data: ____/____/201__

Nome: _____ Espécie: Canídeo Raça: _____
Idade: _____ Sexo: F FC M MC Peso: _____
Tutor: _____ Contacto: _____

Exame dermatológico:

História dermatológica

Início dos sintomas: _____

Sinais clínicos: _____

Tratamento efetuado e/ou atual: _____

Data de início e fim do tratamento: _____

Exame oftalmológico:

Sinais oculares: _____

Início: Agudo / Subagudo / Crónico

Evolução: Estática / Progressiva / Regressiva / Intermitente / Episódica

Tratamento efetuado e/ou atual: _____

	Olho esquerdo	Olho direito
Resposta de ameaça		
Reflexo palpebral		
Reflexo corneano		
RFD		
RFC		
Teste de Schirmer		
PIO		

Biomicroscopia: _____

Fundoscopia: _____

Sinais clínicos de conjuntivite alérgica: avaliação quantitativa

	Olho esquerdo	Olho direito
Corrimento ocular (0 a 3)		
Epífora (0 a 3)		
Hiperémia (0 a 3)		
Prurido (0 a 3)		
Quemose (0 a 3)		
Queratite concomitante (0 a 3)		
Score TOTAL		

Resultados e observações: _____

Colheita da Amostra e Identificação

Colheita de amostra de conjuntiva palpebral após aplicação de anestesia tópica: OD ☐ OE ☐
Dificuldades: _____

Sangrou: Sim ☐ Não ☐

Envio para laboratório com identificação nº _____

Resultados e observações: _____

ANEXO VI: Dados dos animais incluídos no estudo.

	Identificação do animal	Idade (anos)	Género	Raça
Grupo Atópico	A1	5	M	Bouledogue Inglês
	A2	8	F	Cocker Spaniel
	A3	3	F	Cocker Spaniel
	A4	9	F	<i>Retrivier</i> do Labrador
	A5	5	M	Dogue de Bordéus
	A6	8	M	Shih Tzu
	A7	5	F	Shih Tzu
	A8	9	F	Weimaraner
	A9	12	M	Indefinida
	A10	1	F	Bouledogue Francês
	A11	5	F	X American Staffordshire Terrier
	A12	2	F	Bouledogue Inglês
	A13	2	M	Boxer
	A14	2	F	Pastor Alemão
	A15	2	F	Indefinida
	A16	5	F	Border Collie
	A17	4	F	Cão de Água Português
	A18	2	M	Yorshire Terrier
	A19	2	M	Bouledogue Francês
	A20	8	M	Pug
Grupo Controlo	C1	10	M	Malamute do Alasca
	C2	3	M	Pincher
	C3	1	F	Border Collie
	C4	8	M	Pastor Alemão
	C5	5	F	Pincher
	C6	12	M	Indefinida
	C7	7	F	Indefinida
	C8	12	F	Shnauzer Miniatura
	C9	3	M	Pincher
	C10	2	F	Chihuahua
	C11	8	M	Yorshire Terrier
	C12	2	M	Serra da Estrela
	C13	1	F	Pincher
	C14	7	F	Cocker Spaniel
	C15	2	F	<i>Retrivier</i> do Labrador
	C16	6	M	Pastor Alemão
	C17	7	F	Indefinida
	C18	9	F	Bichon Maltês
	C19	2	M	<i>Retrivier</i> do Labrador
	C20	1	F	Border Collie
	C21	1	M	Pastor Australiano

Legenda: F – Feminino, M – Masculino.

ANEXO VII: Resultados dos exames oftalmológicos do grupo controlo e do grupo atópico.

		Resposta de ameaça		Reflexo Palpebral		Reflexo Corneano		RFD		RFC		Teste de Shirmer (mm/min)		PIO (mmHg)		Biomicroscopia		Fundoscopia	
		O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D
Grupo Controlo	C1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	21	21	24	21	N	N	N	N
	C2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	19	15	15	19	N	N	N	N
	C3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	15	19	16	18	N	N	N	N
	C4	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	25	23	15	16	N	N	N	N
	C5	√	x	√	√	√	√	√	√	√	√	21	21	9	11	N	N	N	*
	C6	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	22	17	16	N	N	**	N
	C7	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	16	15	20	18	N	N	N	N
	C8	√	√	√	√	√	√	√	x	x	√	19	9	16	16	***	***	N	N
	C9	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	18	22	18	20	N	N	N	N
	C10	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	16	24	19	18	N	N	N	N
	C11	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	18	17	19	N	N	N	N
	C12	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	24	22	16	17	N	N	N	N
	C13	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	14	13	18	15	N	N	N	N
	C14	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	21	19	16	19	N	N	N	N
	C15	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	16	20	23	15	N	N	N	N
	C16	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	20	23	22	*	N	*	N
	C17	x	x	√	√	√	√	√	√	√	√	15	15	10	10	N	N	N	N
	C18	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	20	13	12	N	*	N	*
	C19	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	22	24	18	17	N	N	N	N
	C20	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	18	20	20	N	N	N	N
	C21	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	15	21	15	15	N	N	N	N

Grupo Atópico	A1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	5	20	12	11	▲	N	N
	A2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	16	21	10	14	▲	N	N
	A3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	13	17	10	10	▲	N	N
	A4	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	21	25	19	16	▲	N	N
	A5	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	17	19	15	15	▲	N	N
	A6	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	15	16	18	19	▲	N	N
	A7	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	15	16	21	14	▲	N	N
	A8	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	17	16	15	14	▲	N	N
	A9	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	19	25	15	14	▲	**	**
	A10	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	17	18	20	17	▲	N	N
	A11	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	22	22	19	23	▲	N	N
	A12	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	14	5	18	17	▲	N	N
	A13	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	24	19	21	19	▲	N	N
	A14	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	15	24	16	8	▲	N	N
	A15	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	21	18	18	18	▲	N	N
	A16	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	25	25	10	10	▲	N	N
	A17	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	22	25	21	25	▲	N	N
	A18	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	18	19	20	19	▲	N	N
	A19	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	20	22	5	16	▲	N	N
	A20	√	√	√	√	√	√	x	x	x	x	13	12	21	18	▲	****	****

Legenda: RFD – Reflexo pupilar direto, RFC – Reflexo pupilar consensual, PIO – Pressão intraocular, O.E. – Olho Esquerdo, O.D. – olho direito, √ - Presente, x - Ausente, N - Normal, * - Catarata madura total, ** - Esclerose senil do cristalino, *** - Atrofia senil da íris, **** - Queratite pigmentar total, ▲ - ver ANEXO VIII.

ANEXO VIII: Avaliação quantitativa dos sinais clínicos de conjuntivite alérgica canina.

	Corrimento Ocular		Epífora		Hiperémia		Prurido		Quemose		Queratite concomitante		Score TOTAL	
	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D	O.E	O.D
A1	3	3	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	12	12
A2	0	0	2	0	3	3	1	1	3	3	0	0	9	7
A3	1	1	0	0	2	2	3	3	2	2	0	0	8	8
A4	1	1	0	0	2	2	1	1	2	2	0	0	6	6
A5	0	1	0	0	3	3	1	1	3	3	0	0	7	8
A6	0	0	1	1	3	3	1	1	3	3	1	0	9	8
A7	1	1	0	0	2	3	1	2	2	2	1	1	7	9
A8	0	0	0	0	2	3	1	1	2	3	0	0	5	7
A9	0	0	0	0	2	2	1	1	2	2	0	0	5	5
A10	0	0	1	1	2	2	1	1	3	3	0	0	7	7
A11	0	0	1	0	3	3	2	2	2	2	0	0	8	7
A12	2	1	0	0	3	3	1	1	3	3	0	0	9	8
A13	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2	0	0	5	4
A14	1	1	0	0	2	3	3	3	1	2	0	1	7	10
A15	1	0	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	6	5
A16	0	0	0	0	3	3	1	1	3	3	1	0	8	7
A17	2	2	0	0	2	1	2	2	2	2	0	0	8	7
A18	2	1	0	0	2	2	1	1	3	2	0	0	8	6
A19	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	9	9
A20	1	2	0	0	3	3	3	3	2	2	3	3	12	13

Legenda: 0 – Ausente, 1 – Ligeiro, 2 – Moderado, 3 – Grave.

ANEXO IX: Score total obtido para cada animal do grupo atópico através da aplicação do (CADESI)-4.

Identificação do Animal	Score TOTAL
A1	34
A2	20
A3	18
A4	33
A5	49
A6	29
A7	49
A8	44
A9	25
A10	46
A11	43
A12	30
A13	39
A14	28
A15	26
A16	26
A17	23
A18	13
A19	43
A20	29

